

DIE SYNTHESE VON SH-REAGENTIEN
UND IHRE WIRKUNGSWEISE AUF
LACTATDEHYDROGENASE

Jochen Schnetger

1966

DIE SYNTHESE VON SH-REAGENTIEN
UND IHRE WIRKUNGSWEISE AUF
LACTATDEHYDROGENASE.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main.

Vorgelegt von
Jochen Schnetger
aus Berlin

1966

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Frankfurt am Main



Dekan: Prof. Dr. J. Stauff

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. G. Pfeleiderer

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Wieland

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.1966

1. Einleitung.	1
2. Haupttheil des Buchs.	2
3. Zusammenfassung.	3
4. Schluss.	4
5. Literaturverzeichnis.	5
6. Register.	6
7. Anhang.	7
8. Nachwort.	8
9. Danksagung.	9
10. Verlagsangabe.	10

Meinen Eltern gewidmet.

1. Einleitung.	1
2. Haupttheil des Buchs.	2
3. Zusammenfassung.	3
4. Schluss.	4
5. Literaturverzeichnis.	5
6. Register.	6
7. Anhang.	7
8. Nachwort.	8
9. Danksagung.	9
10. Verlagsangabe.	10
11. Bibliographie.	11
12. Glossar.	12
13. Index.	13
14. Literaturverzeichnis.	14
15. Register.	15
16. Anhang.	16
17. Nachwort.	17
18. Danksagung.	18
19. Verlagsangabe.	19
20. Bibliographie.	20
21. Glossar.	21
22. Index.	22
23. Literaturverzeichnis.	23
24. Register.	24
25. Anhang.	25
26. Nachwort.	26
27. Danksagung.	27
28. Verlagsangabe.	28
29. Bibliographie.	29
30. Glossar.	30
31. Index.	31
32. Literaturverzeichnis.	32
33. Register.	33
34. Anhang.	34
35. Nachwort.	35
36. Danksagung.	36
37. Verlagsangabe.	37
38. Bibliographie.	38
39. Glossar.	39
40. Index.	40
41. Literaturverzeichnis.	41
42. Register.	42
43. Anhang.	43
44. Nachwort.	44
45. Danksagung.	45
46. Verlagsangabe.	46
47. Bibliographie.	47
48. Glossar.	48
49. Index.	49
50. Literaturverzeichnis.	50
51. Register.	51
52. Anhang.	52
53. Nachwort.	53
54. Danksagung.	54
55. Verlagsangabe.	55
56. Bibliographie.	56
57. Glossar.	57
58. Index.	58
59. Literaturverzeichnis.	59
60. Register.	60
61. Anhang.	61
62. Nachwort.	62
63. Danksagung.	63
64. Verlagsangabe.	64
65. Bibliographie.	65
66. Glossar.	66
67. Index.	67
68. Literaturverzeichnis.	68
69. Register.	69
70. Anhang.	70
71. Nachwort.	71
72. Danksagung.	72
73. Verlagsangabe.	73
74. Bibliographie.	74
75. Glossar.	75
76. Index.	76
77. Literaturverzeichnis.	77
78. Register.	78
79. Anhang.	79
80. Nachwort.	80
81. Danksagung.	81
82. Verlagsangabe.	82
83. Bibliographie.	83
84. Glossar.	84
85. Index.	85
86. Literaturverzeichnis.	86
87. Register.	87
88. Anhang.	88
89. Nachwort.	89
90. Danksagung.	90
91. Verlagsangabe.	91
92. Bibliographie.	92
93. Glossar.	93
94. Index.	94
95. Literaturverzeichnis.	95
96. Register.	96
97. Anhang.	97
98. Nachwort.	98
99. Danksagung.	99
100. Verlagsangabe.	100

INHALTSVERZEICHNIS.

	Seite
I. Einleitung.	8
II. Theoretischer Teil.	11
1. Reagentien mit reaktivem Halogen.	11
2. Reaktionen mit Cystein und LDH.	19
3. Umsetzung von Maleinimiden mit Cystein und LDH.	26
4. Radioaktive Markierung von in LDH eingebautem m-Bromphenylmaleinimid.	32
5. Bedeutung der Maleinimide für die Aufklärung der Tertiärstruktur der LDH.	36
III. Experimenteller Teil.	37
1. Synthesen von Nucleotiden, Pyridiniumsalzen und Maleinimiden.	37
a. Darstellung von 6-Mercaptopurinribotid.	37
b. Darstellung von 6-Chlorpurinribotid.	38
c. Darstellung von N-(n-butyl-3-acetylpyridinium)-bromid.	46
d. Reinigung von 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid.	48
e. Darstellung von m-Jodphenylmaleinimid.	49
f. Darstellung von m-Chlorphenylmaleinimid.	50
g. Darstellung von m-Bromphenylmaleinimid.	50
h. Darstellung von N-(γ-phenyl-n-butyl)-maleinimid.	52
2. Aktivierung von Brom in Maleinimiden.	54
a. Darstellung und Isolierung von m-Brom ⁸² phenylmaleinimid durch Bestrahlung von m-Bromphenylmaleinimid mit langsamen Neutronen.	54
b. Neutronenbeschuss von p-Bromphenylmaleinimid.	56
3. Messungen.	58
a. SH-Gruppenbestimmung mit DTNB.	58
b. Reinigung von LDH aus Schweineherzen.	59
c. Umsetzung von 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid mit Cystein und LDH.	62

III. 3. d. Methoden bei den Umsetzungen von Bromaceton, m-Jod-, m-Chlor-, m-Bromphenylmaleinimid und N-(γ -phenyl-n-butyl)-maleinimid mit Cystein und LDH.	Seite 66
e. Löslichkeit der Maleinimide in Puffer.	70
f. Vorbereitung zur Aktivierung von m-Bromphenylmaleinimid in LDH.	71
IV. Zusammenfassung.	73
V. Literaturverzeichnis.	74
VI. Lebenslauf.	79

Abkürzungen.

NAD : Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, früher DPN,
NADH : 1,4-Dihydro-NAD, früher DPNH,
LDH : Lactatdehydrogenase,
NMN : Nicotinamidmononucleotid,
TFA : Trifluoressigsäureanhydrid,
DTNB : 5,5'-Dithiobis-(-2-nitrobenzoesäure),
6-Mercaptopurinribotid : 6-Mercapto-9-(- β -D-ribofuranosyl)-pu-
rin-5'-phosphat,
6-Chlorpurinribotid : 6-Chlor-9-(- β -D-ribofuranosyl)-purin-
5'-phosphat.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

I Einleitung.

Für die Aktivität vieler Enzyme sind SH-Gruppen aus Cysteinresten essentiell. Man kann diese Enzyme ganz oder teilweise hemmen, wenn man sie mit Verbindungen, die aktive Halogenatome oder Doppelbindungen enthalten, umsetzt.

Eines der ersten Reagentien mit reaktivem Halogen, das zur Hemmung des Ablaufs biochemischer Reaktionen (Glykolyse, Alkoholbildung) verwandt wurde, war Jodacetat. (1) Es konnte gezeigt werden, dass dieses Reagenz einen Inhibitor für gewisse Enzyme, darunter Alkoholdehydrogenase oder Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, darstellt. (2, 3)

In den folgenden Jahren wurden Modellreaktionen von Jodacetat mit SH-Gruppen verschiedener Verbindungen wie Thioglycolat, α -Thio-lactat, Cystein, Glutathion und schliesslich auch mit Protein durchgeführt, wobei die SH-Gruppen jeweils unter Freiwerden von Jodwasserstoff alkyliert wurden. (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) In der Folgezeit wurden weitere mit SH-Gruppen reagierende Reagentien entwickelt.

Im Jahre 1948 beschrieb Lewis (11) die Hemmung verschiedener Enzymsysteme mit essentiellen SH-Gruppen durch Methylbromid und die Reaktion dieses Reagenzes mit Cystein und Glutathion. Andere Autoren verwandten Methylbromid zur Hemmung der im Gehirn vorkommenden Hexokinase. (12)

In der Reihe der verschieden halogenisierten Essigsäuren wurden von Bartlett und Barron unterschiedliche Reaktionen gegenüber SH-Gruppen festgestellt. Sie fanden, dass die Reaktionsfähigkeit vom Fluor- über Chlor- und Brom- zum Jodacetat zunahm. (13)

Der Zusammenhang zwischen Bindungsenergie der Kohlenstoffhalogenverbindung und Elektronegativität einerseits und der Reaktionsfähigkeit der Halogenatome andererseits war ersichtlich. Fluorpyruvat dagegen setzte sich gut mit Mercaptoderivaten um (14) und hemmte die oxydative Aktivität von mitochondrialen Herzmuskelpräparaten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieses Reagenz Inhibitoreigenschaften in Bezug auf die Aktivität von DPNH oxydierenden Dehydrogenasen aufweist. Die Hemmungen beruhen hier auf

einer weitgehenden Blockierung von essentiellen SH-Gruppen.

Busch et al. untersuchten die Hemmwirkung von Fluorpyruvat auf LDH (15) und fanden eine zum Teil reversible, zum Teil irreversible Hemmung. Cystein schützte nicht vor dem Angriff des Reagenzes, so dass eine SH-Blockierung ausschied. Die Autoren schlossen daraus, dass neben der Ausbildung eines reversiblen Ternärkomplexes zwischen Enzym, DPNH und Fluorpyruvat, auch teilweise enzymatische Hydroxy- und Aminogruppen angegriffen wurden. Dieses führte zu der beobachteten teilweise irreversiblen Hemmung.

Dixon (16, 17) und Ford-Moore (18) berichteten 1948 über den Zusammenhang zwischen Reaktivität von Halogenatomen und Tränengaswirkung. Es konnte gezeigt werden, dass die Eigenschaft der Tränengaswirkung von Verbindungen mit der Reaktivität der Halogenatome in diesen Verbindungen gegenüber SH-Gruppen im Zusammenhang stand. (16, 19, 20)

Die Reaktionen von Senfgasen mit SH-Gruppen war schon 1920 von Helfrich et al. beschrieben worden. (21) Die Autoren waren der Ansicht, dass die Reaktion dieser Verbindungen mit SH-Gruppen eine einfache Alkylierung nach dem Schema :



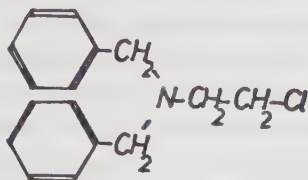
darstellte.

Es konnte jedoch später gezeigt werden, dass sich der Mechanismus sowohl bei den Stickstoff- als auch bei den Schwefelsenfgasen komplizierter gestaltete, indem bei den Stickstoffverbindungen z.B. intermediär zunächst eine Äthylenimmoniumstruktur ausgebildet wird und entsprechend bei den Schwefelanalogen eine Sulfoniumstruktur. (22)

Die Reaktion dieser Verbindung beschränkte sich natürlich nicht nur auf SH-Gruppen alleine sondern sie reagierte z.B. auch mit Carboxylgruppen in Proteinen. (22, 23)

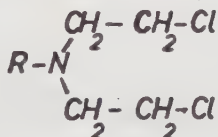
Schliesslich seien noch die β -Halogenalkylamine als andere Form von Reagenzien mit reaktiven Halogen erwähnt. Die Untersuchungen

auf Reaktionsfähigkeit mit SH-Gruppen wurden speziell am Dibenzamin durchgeführt. (22, 24)



Auch hier wird bei der Reaktion mit SH-Gruppen, wie oben schon erwähnt, intermediär eine Äthylenimmoniumstruktur ausgebildet. Die Affinität des Dibenzamins gegenüber SH-Gruppen erwies sich wesentlich grösser als gegenüber Carboxy- und Aminogruppen.

Aktuelle Bedeutung haben Verbindungen mit reaktiven Halogen des Typs



bei der Krebschemotherapie, wie in den Nachrichten aus Chemie und Technik 1966 berichtet wurde. (25)

Die ersten Reaktionen von enzymatischen SH-Gruppen mit Doppelbindungen wurden von Morgan und Friedman 1938 mit Maleinsäureanhydrid an Succinodehydrogenase durchgeführt. (26) Man erkannte jedoch bald, dass die Doppelbindungen von Maleinimiden und Chinonen grössere Reaktionsfähigkeit gegenüber SH-Gruppen besitzen als die des Maleinsäureanhydrids. (27, 28, 29) In den folgenden Jahren wurde die physiologische Wirksamkeit von Maleinimiden und Chinonen studiert. (28, 30, 31)

Im Jahre 1958 brachte Schöberl (32) eine erste Zusammenstellung kinetischer Daten der Reaktionen verschiedener Maleinimide mit Cystein, Glutathion und Succinodehydrogenase.

Die Reaktionen besonders von N-Äthylmaleinimid, Chinonen und

gefärbten Maleinimiden (2,4-Dinitrophenylmaleinimid) mit Glutathion, Cystein und den verschiedensten Enzymen wurde eingehend studiert. (33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40) Weiterhin war es 1956 gelungen, SH-Gruppen nach Umsetzung mit Maleinimiden durch Farbreaktionen der Umsetzungsprodukte nachzuweisen, entweder durch alkalische Behandlung, wobei eine Verfärbung eintrat, z.B. nach Umsetzung mit N-Äthylmaleinimid (47), oder durch Kupplung mit Diazoniumsalzen, nach Reaktion mit N-(4-hydroxy-1-naphthyl)-isomaleinimiderivaten. (48, 49)

In neuester Zeit gelang es, mit Hilfe gefärbter und vor allen Dingen radioaktiv markierter Maleinimide die Lage von SH-Gruppen in Enzymen zu bestimmen und Aminosäuresequenzen in der Nachbarschaft funktioneller SH-Gruppen aufzuklären. (40, 41, 42, 43, 50) Technische Bedeutung haben die Maleinimide als Copolymere bei der Kautschukherstellung und als Insektenbekämpfungsmittel erlangt. (45, 44, 46)

II Theoretischer Teil.

II 1 Reagentien mit reaktivem Halogenatom.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die essentiellen SH-Gruppen der Lactatdehydrogenase aus Schweineherzen (LDH) mit reaktivem Halogen enthaltenden Verbindungen anzugreifen, um eine irreversible Hemmung zu erzielen.



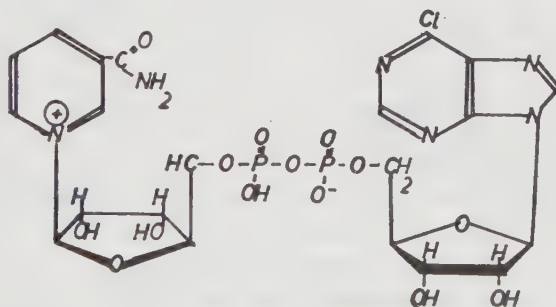
X = Halogen

Die in dieser Richtung unternommenen Hemmversuche mit Jodacetamid und Jodacetat (22, 40, 51) haben gezeigt, dass von diesen Reagentien, obwohl sie reaktive Halogenatome enthalten, die essentiellen SH-Gruppen an nativer LDH nicht angegriffen wurden und keine Hemmung erzielt werden konnte. Die SH-Gruppen wurden lediglich nach Entfaltung des Proteins durch Harnstoffbehandlung

dem Angriff von Jodacetat zugänglich. (53) Die mit Fluorpyruvat erzielte Hemmung der LDH beruht nicht auf der Blockierung von SH-Gruppen, wie schon in der Einleitung erwähnt wurde. (15) Ein im Sinne des Reaktionsschemas I wirkungsvolles Reagenz muss zunächst die Möglichkeit haben, in die Nähe der essentiellen SH-Gruppen zu gelangen, die anscheinend in der LDH schwer zugänglich sind, um mit diesen reagieren zu können. (33, 40)

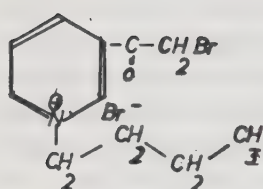
Eine Verbindung, die ein NAD-Analoges oder ein Coenzymmodell darstellt, hat die nötigen Eigenschaften, um nahe genug an das aktive Zentrum der LDH zu gelangen. (52) Enthält diese Verbindung reaktives Halogen, so sollte dieses mit den im aktiven Zentrum der LDH befindlichen SH-Gruppen reagieren können und eine irreversible Hemmung der Enzymaktivität bewirken.

Als NAD-Analoges mit reaktivem Halogen schien Nicotinamid-6-chlorpurindinucleotid am geeignetsten.

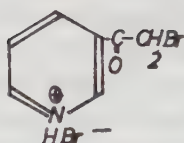


Als Vertreter der Coenzymmodelle mit reaktivem Halogen wurden die Pyridiniumsalze N-(n-butyl-3-bromacetylpyridinium)-bromid I und 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid II gewählt. (Abb. der Formeln siehe nächste Seite.)

Die Inhibitorwirkung von Pyridiniumsalzen und N-Alkylnicotinamidverbindungen auf Alkoholdehydrogenase war bereits von N.O. Kaplan (56) und A. Anderson (57) untersucht worden.



I



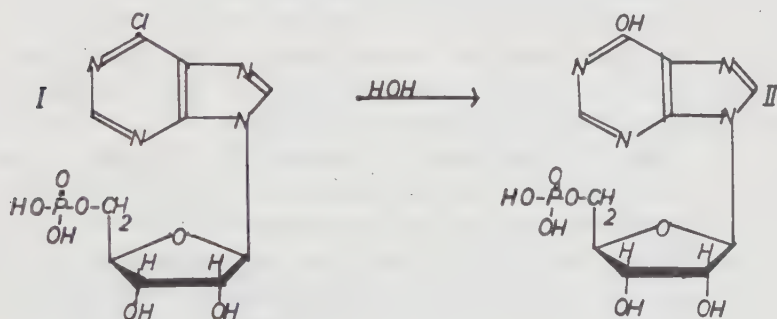
II

Wir wandten uns zunächst der Synthese des NAD-Analogen Nicotinamid-6-chlorpurindinucleotid zu.

Als Ausgangsprodukt bei der Synthese sollte 6-Chlorpurinribotid dienen, das schon von Hampton et al. (58) dargestellt worden war. Da jedoch die beschriebene Synthese sehr kompliziert verläuft, wählten wir einen neuen Weg, der eine wesentliche Vereinfachung versprach. Hierzu gingen wir vom 6-Mercaptopurinribotid aus, das wir analog dem Verfahren zur Darstellung von 6-Chlorpurinribosid aus 6-Mercaptopurinribosid chlorierten. (64) Wir arbeiteten zu diesem Zweck ein Verfahren aus, mit dessen Hilfe es möglich war, genau definierte Mengen Chlorgas zur Reaktion mit in Methanol suspendiertem 6-Mercaptopurinribotid zu bringen. (Siehe Abb. 12, siehe Seite 40).

Das bei der Chlorierung von 6-Mercaptopurinribotid mit dem ca. zwanzigfachen Überschuss an Chlor erhaltene Rohprodukt, welches als Bariumsalz abgetrennt wurde, enthielt drei Verbindungen, wie chromatographisch festgestellt werden konnte. (Siehe Abb. 14, siehe Seite 42). Wir änderten nun das angewandte Chlorierungsverfahren in der Hoffnung ab, eine eindeutigere Ausbeute an 6-Chlorpurinribotid zu erhalten. (s.S. 42) Dazu wurden äquivalente Mengen Chlor mit 6-Mercaptopurinribotid umgesetzt, und das erhaltene Rohprodukt nicht als Bariumsalz isoliert, sondern das Lösungsmittel unter Eiskühlung im Vakuum bei 3 Torr abdestilliert. Das zurückbleibende, langsam erstarrende gelbe Öl enthielt eine Reihe von Komponenten. (s.Abb. 15) Eine Identifizierung des gewünschten Produktes war nicht möglich.

Wir wählten daher für unsere weiteren Umsetzungen das zuerst skizzierte Verfahren. Die Isolierung des 6-Chlorpurinribotids aus dem Dreikomponentengemisch (s.o.) bereitete erhebliche Schwierigkeiten. Trennungsversuche über Dowex 50 H^+ ergaben, dass das im aufgegebenen Stoffgemisch enthaltene 6-Chlorpurinribotid auf der Säule, wahrscheinlich durch Dowex 50 H^+ katalysiert, hydrolysierte, wie die eindeutige Verschiebung des Absorptionsmaximums im UV des im Rohprodukt enthaltenen 6-Chlorpurinribotids I von 263 m μ (58) nach 247 m μ des im Eluat befindlichen Hauptproduktes zeigte. Die Lage des Absorptionsmaximums bei 247 m μ entspricht der Lage des Maximums der Inosinsäure II. Die Hydrolyse wäre nach dem folgenden Schema denkbar:



Dieses Säulenmaterial schied also für die Reindarstellung des 6-Chlorpurinribotids aus. Nach Versuchen mit den verschiedensten Ionenaustauschern (s.S.44) gelang schliesslich die Reindarstellung aus dem Rohprodukt über Cellulose Eteola in Anlehnung an die Methode von Hampton et al..(58) Die Ausbeute war minimal.

Das 6-Chlorpurinribotid wurde durch Ribose-Phosphat-Bestimmung (67, 68), Rf-Wert (66), Absorptionsmaximum (58) und Chlornachweis identifiziert. Ausserdem wurde ein IR-Spektrum aufgenommen. (s.Abb. 16)

Die Ausbeute war zu gering, um eine Kondensationsreaktion des 6-Chlorpurinribotids mit Nicotinamidmononucleotid (NMN) zum Nicotinamid-6-chlorpurindinucleotid durchführen zu können. Aus diesem Grunde kondensierten wir das bei der Chlorierung von SH-Purinribotid erhaltene und als Bariumsalz abgetrennte Rohprodukt direkt mit NMN, in der Hoffnung, das gewünschte Dinucleotid aus dem Reaktionsansatz über eine Austauschersäule isolieren zu können. Es wurde hierzu die Kondensationsmethode nach Schuster et al. (69), die mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFA) als wasserentziehendem Mittel durchgeführt wird, gewählt, da das Bariumsalz des Ausgangsproduktes (s.o.) in TFA löslich ist. Die Methode nach Todd et al. (70), die mit Dicyclohexylcarbodiimid als wasserentziehendes Mittel in Pyridin durchgeführt wird, erschien uns nicht so aussichtsreich. Der in unserem Falle als Bariumsalz vorliegende Ausgangsstoff, der ja ein Rohprodukt darstellt (s.o.), löst sich nicht in Pyridin auf und hätte erst in die lösliche Form überführt werden müssen. Das schien uns in Anbetracht des als Gemisch dreier Stoffe in Form des Bariumsalzes vorliegenden Rohproduktes und hinsichtlich der Labilität des Chlors im darin enthaltenen 6-Chlorpurinribotid nicht sehr günstig, da möglicherweise zusätzliche Reaktionsprodukte zu erwarten waren. Wir führten also die Kondensation mit TFA durch und konnten im Endprodukt kein Chlor mehr nachweisen. Ein Dinucleotid war jedoch entstanden. Es gelang nämlich, über Dowex 1-formiat durch Gradientenelution mit Ameisensäure ein aus zwei Verbindungen bestehendes Produkt zu isolieren, (s.Abb. 1) dessen Michaeliskonstante an LDH aus Schweineherzen gemessen $1,82 \times 10^{-4}$ m betrug. Die Michaeliskonstante von NAD zum Vergleich beträgt $0,8 \times 10^{-4}$ m.

Im umseitigem Pherogramm (s.Abb. 1) zeigte Bande I bei Behandlung mit Butanon-Ammoniak-Dämpfen eine gelbe Fluoreszenz. (72) Ein nochmals wiederholter Chlornachweis fiel auch für dieses Rohprodukt negativ aus. Das von uns gewünschte Nicotinamid-6-chlorpurindinucleotid war nicht entstanden.

Die Vermutung lag nahe, dass das in dem zur Kondensation mit NMN eingesetzte Bariumsalz (s.o.) befindliche 6-Chlorpurinribotid während der Kondensationsreaktion hydrolisierte. Wir be-

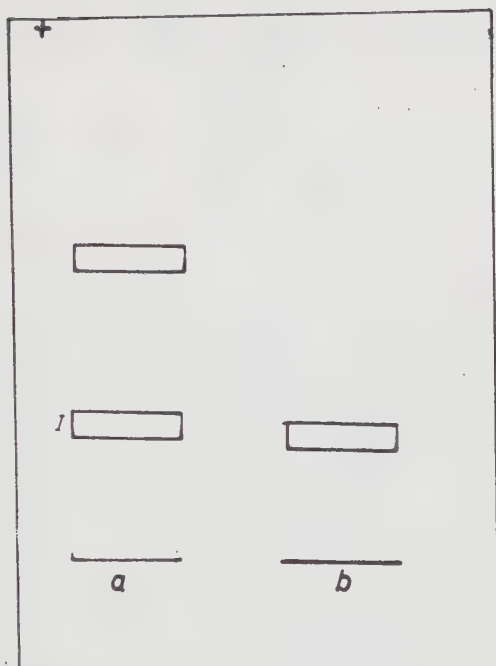


Abb. 1. Pherogramm des bei der Gradientenelution isolierten enzymatisch aktiven Rohproduktes: (a) Als Vergleichssubstanz lief NAD mit. (b)

Laufzeit: 2,5 Stunden, Stromstärke: 30 mAmp.

m/10 Trispuffer PH 8,0

handelten deshalb das in Form des Bariumsalzes vorliegende Ausgangsprodukt mit TFA unter den gleichen Bedingungen wie sie zur Durchführung der Kondensation mit NMN erforderlich waren und verfolgten das Absorptionsspektrum des in TFA löslichen Bariumsalzes. Wie stellten fest, dass sich das Absorptionsmaximum von 263 m μ , das dem des 6-Chlorpurinribotids entspricht (58), eindeutig nach 247 m μ , dem der Inosinsäure, einem möglichen Hydrolyseprodukt, verschiebt.

Die Kondensationsmethode erwies sich also wegen der offensichtlichen Labilität des Chlors in 6-Chlorpurinribotid als ungeeignet. Die Kondensationsmethode nach Todd et al. versprach, wie schon erwähnt, ebenfalls wenig Erfolg.

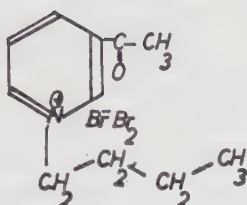
Die Vorstellung von einer im Sinne des Reaktionsschemas I (s. Seite 11) wirksamen Verbindung, die reaktives Halogen enthielt, erfordert nicht die ausschliessliche Notwendigkeit eines NAD-Analogen zur Erreichung der gewünschten irreversiblen Hemmung. Es musste auch möglich sein, mit einem entsprechenden Coenzymmodell zum Ziel zu kommen.

Wir wandten uns daher der Synthese von Acetylpyridiniumsalzen zu, die in der Acetylgruppe halogenisiert sind. Das Halogenatom (Brom) ist auf Grund der Nachbarstellung zur Ketogruppe aktiviert und daher sehr reaktiv. Zunächst synthetisierten wir N-(n-butyl-3-acetylpyridinium)-bromid nach Analogvorschriften, (76, 81, 82), (s.S.46'). Diese Verbindung ist unseres Wissens nach noch nicht dargestellt worden. Wir versuchten nun, Brom in die Acetylgruppe einzuführen. Eine in Eisessig durchgeführte Bromierung (73) in Abwandlung einer Analogvorschrift (74) führte zu einem ockerfarbenen Produkt, welches sich im Exsikkator über P_2O_5 zersetzte. Beim Auflösen des Produktes in H_2O wurde Brom in Freiheit gesetzt. Das in Lösung befindliche Produkt war nach Pherogramm und Spektrum identisch mit dem Ausgangsprodukt (N-(n-butyl-3-acetylpyridinium)-bromid). Die Substanz reagierte mit Aceton unter Bildung von Bromaceton. (74, 75) Die beschriebene Verhaltensweise deutete daraufhin, dass es sich hier um ein Bromid-perbromidsalz handelte. (74, 76) Eine quantitative Brombestimmung, durchgeführt im Institut für Anorganische Chemie, bestätigte diese Vermutung.

Theoretischer Bromgehalt: 55,6 %

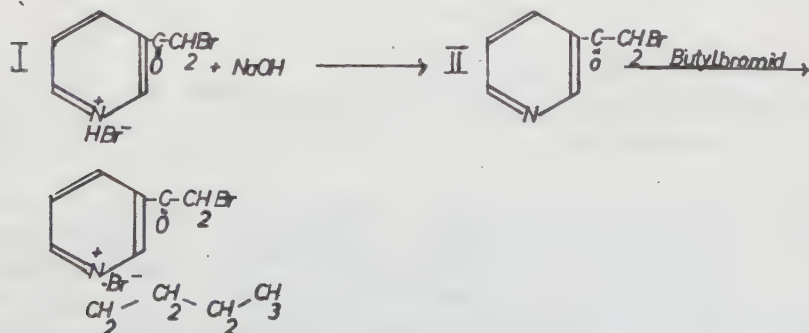
Gefundener Bromgehalt: 57,3 %.

Die Verbindung hatte vermutlich folgende Struktur:



Wir versuchten nun, N-(n-butylacetylpyridinium)-bromid nach Lösen in konzentrierter Bromwasserstoffsäure in der Acetylgruppe zu bromieren, analog der Bromierung von 3-Acetylpyridin (77, 78) und 2-Methyl-3-acetylpyridin. (79, 80) Das resultierende Stoffgemisch wurde photographiert und der Behandlung mit Butanon-Ammoniak ausgesetzt. (72) Es konnte keine Fluoreszenz, die ja für N-substituierte Pyridinderivate charakteristisch ist, festgestellt werden. Ebenso reagierte das entstandene Rohprodukt nicht mehr mit Cyanid wie das Ausgangsprodukt. (71), (s.S.48) Offenbar war bei der Bromierung die aktivierte 4-Stellung im Pyridinkern des Ausgangsstoffes (s.o.) angegriffen worden. Wir versuchten nun, die Darstellung des gewünschten N-(n-butyl-3-bromacetylpyridinium)-bromid durch Alkylierung des Heterostickstoffs von 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid zu erreichen.

Die Reaktion sollte nach folgendem Schema vor sich gehen:



Die durch äquivalente Mengen von NaOH aus I in Freiheit gesetzte Base II erwies sich jedoch als so instabil, indem sie offensichtlich sofort nach Freisetzung polymerisierte, dass eine definierte Alkylierung des Ringstickstoffs nicht mehr möglich war. Wir erhielten jeweils uneinheitliche Stoffgemische bei der Alkylierung, die nach pherographischer Auftrennung weder nach Ladung noch nach ihrer negativen Reaktion bei Behandlung mit Butanon-Ammoniakdämpfen (72) das gewünschte Produkt enthielten. In keinem Falle konnte eine Cyanidaddition nachgewiesen werden. (71) Da also die Synthese des N-(n-butyl-3-bromacetylpyridinium)-bromid unter den beschriebenen Bedingungen nicht gelungen war, untersuchten wir das 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid, das als Coenzymmodell mit reaktivem Halogen aufgefaßt werden kann und das schon in der Literatur beschrieben worden ist, (77, 78) hinsichtlich seiner Wirkungsweise als Inhibitor für LDH.

Zunächst arbeiteten wir für das nach Dornow et al. (77) dargestellte Hydrobromid eine Methode zur Reindarstellung aus (s. Seite 48). Die Bande des Hydrobromids wurde auf dem Pherogramm, nachdem das Papier einige Zeit Ammoniakdämpfen ausgesetzt worden war, durch Auftreten einer Gelbfärbung sichtbar. Diese Gelbfärbung war vermutlich auf die Polymerisationsreaktion der durch Ammoniak aus dem Hydrobromid in Freiheit gesetzten Base hervorgerufen worden. Eine ähnliche Beobachtung hatten wir schon bei dem oben beschriebenen Syntheserversuch von N-(n-butyl-3-bromacetylpyridinium)-bromid gemacht.

II 2 Reaktionen mit Cystein und LDH.

Reaktionen von 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid mit Cystein und LDH aus Schweineherzen.

3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid reagierte, wie erwartet, praktisch sofort und quantitativ mit der SH-Gruppe von Cystein, wie mit 5,5'-Dithiobis-(-2-nitrobenzoesäure) (DTNB) nachgewiesen werden konnte. (90), (s.S.62) Zum weiteren Beweis dafür, dass sich das Hydrobromid mit Cystein umgesetzt hatte, isolierten wir das bei der Reaktion entstandene Rohprodukt nach zehn-

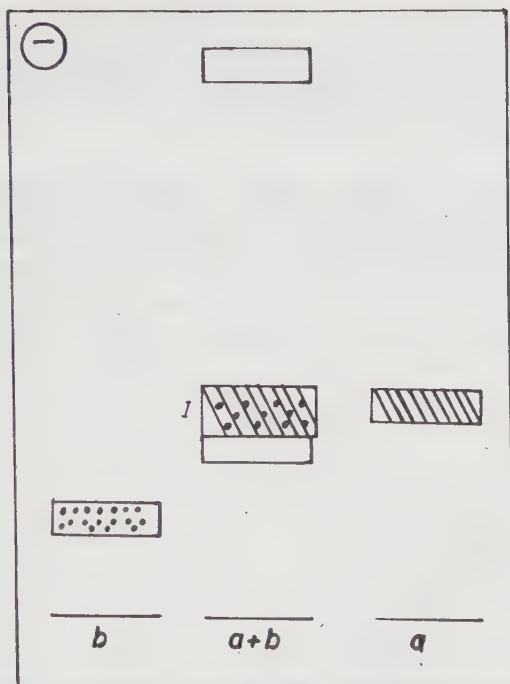


Abb. 2. Pherogramm des bei der Umsetzung von 3-Bromacetylpyridinhydrobromid (b) und Cysteinhydrochlorid (a) entstandenen Produktes (a + b).

.... Gelbfärbung mit Ammoniakdämpfen;

////// Ninhydrinreaktion.

Laufzeit: 45 Minuten; Stromstärke: 30 mAmp.; Puffer: PH 1,9

minütiger Reaktionszeit aus der wässrigen Lösung durch Gefrier-trocknung. Es resultierte ein dunkelrotes, langsam erstarrendes Öl. Von dieser Substanz fertigten wir ein Pherogramm an. (s. Abb. 2.)

Das entstandene Hauptprodukt (Bande I) zeigte auf dem Papier bei Behandlung mit Ammoniakdämpfen die schon beschriebene Gelbfärbung. Ein vor der Ammoniakbehandlung abgetrennter Teil der Bande I , der mit Ninhydrin behandelt wurde, ergab die erwartete charakteristische Reaktion. Das bei der Reaktion entstandene

Hauptprodukt enthielt also die Komponenten a und b.

Wir setzten nun das 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid mit LDH um und erhielten die von uns erwarteten und im folgenden dargestellten Ergebnisse:

3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid reagierte zunächst im hundertfachen Überschuss, bezogen auf die im Reaktionsansatz befindliche LDH. (s.S. 62 ,s.Abb.3.)

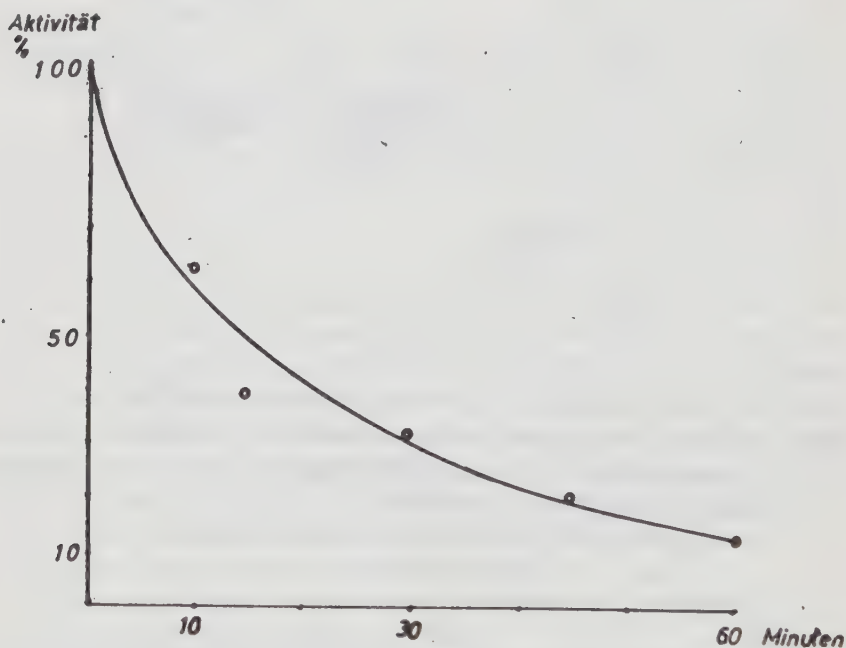


Abb. 3. Hemmung von LDH (3×10^{-5} molar) mit 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid (3×10^{-3} molar).

T = 25 ° C.

Bereits nach 60 Minuten erhielten wir eine 82 prozentige Hemmung der LDH. Dieses Ergebnis entsprach unserer Annahme, dass das Hydrobromid einen wirksamen Inhibitor für LDH darstellt. Da aber bei einem so grossen Überschuss an Hemmstoff die Inhibitorwirkung nicht nur durch Reaktion mit den essentiellen SH-Gruppen auftreten

kann, sondern durch unübersichtliche Nebeneffekte - wie Zerstörung der Tertiärstruktur oder unspezifische Angriffe sämtlicher SH- oder z.B. NH_2 -Gruppen - hervorgerufen werden kann, setzten wir die LDH nur mit dem zehnfachen Überschuss an Hydrobromid um. (s.S.63)

Wenn die Vorstellung richtig ist, dass das 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid auf Grund seines Coenzymmodellcharakters bevorzugt in das aktive Zentrum gelangt und dort infolge seiner chemischen Beschaffenheit mit den essentiellen SH-Gruppen reagiert, musste eine Hemmung mit LDH zu beobachten sein. (s.Abb.4.)

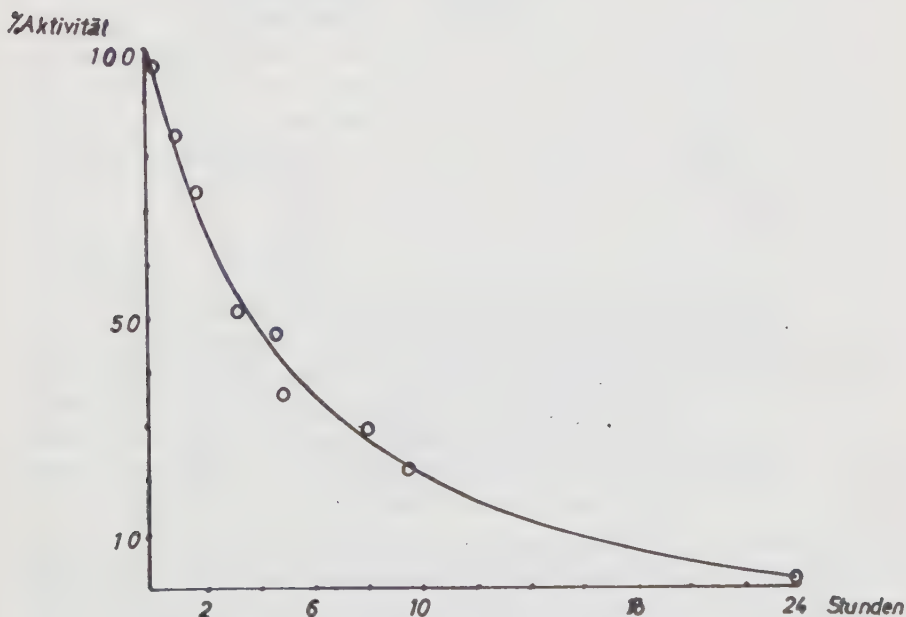


Abb. 4. Hemmung von LDH ($3,2 \times 10^{-5}$ molar) mit 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid ($3,2 \times 10^{-4}$ molar).
T = 25 ° C.

Wie ersichtlich, erhielten wir nach 24 Stunden eine 98 prozentige Hemmung. Wir prüften nun die Spezifität der Reaktion des Hydrobromids mit den vier essentiellen SH-Gruppen in der LDH nach,

indem wir ihre Anzahl vor und nach der Umsetzung mit dem Hydrobromid quantitativ bestimmten. Zu diesem Zweck wurde, wie auf Seite 59 beschrieben, die ungehemmte LDH dialysiert und über Sephadex G 50 entsalzt. Die Anzahl der SH-Gruppen wurde mit Hilfe von DTNB (s.S.58) bestimmt. Wir erhielten pro Molekül LDH 16,1 SH-Gruppen.

Nun wurde die dialysierte LDH mit dem zehnfachen Überschuss an 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid 24 Stunden umgesetzt. (s.Abb. 4. und S.63) Das überschüssige Hydrobromid konnte durch Gelfiltration über Sephadex G 50 von der gehemmten LDH abgetrennt werden (Elutionsdiagramm auf S.65), die auf Grund ihres hohen Molekulargewichtes zuerst erschien. Die Bestimmung der Zahl der noch freien SH-Gruppen ergab 12,2 bzw. 12,4 pro Molekül LDH. Es waren also tatsächlich durch das Hydrobromid nur die vier essentiellen SH-Gruppen angegriffen worden. Dieses Ergebnis schliesst jedoch die Möglichkeit nicht aus, dass eventuell ebenfalls im aktiven Zentrum befindliche Imidazolreste durch das 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid angegriffen werden können.

Um zu zeigen, dass überhaupt eine Reaktion zwischen dem Hydrobromid (a) und dem Imidazol (b) stattfindet, setzten wir äquivalente Mengen der beiden Verbindungen in m/15 Sörensenpuffer PH 7,1 bei 25 ° C. um. Nach mehrstündigem Stehen (3 - 4 Stunden) färbte sich die Reaktionslösung rotbraun. Aus diesem Ansatz wurde eine Probe pherographiert. Zum Nachweis einer Reaktion liessen wir die Ausgangssubstanzen mitlaufen. (s.Abb. 5.) Das Pherogramm zeigt das Auftreten eines neuen Produktes.

Die Hauptbande I reagiert mit Ammoniakdämpfen positiv (s. auch Abb.2.), jedoch nicht mehr mit Paulyreagenz.

Um zu beweisen, dass die Reaktivität des Bromatoms in der Acetylgruppe allein nicht ausreicht, um eine gute Inhibitorwirkung zu erzielen, sondern dass hier die Struktur der Verbindung eine wesentliche Rolle spielt, untersuchten wir die Reaktion von Bromaceton mit Cystein und LDH. Dieses Reagenz wurde gewählt, weil hier das Bromatom - wie in 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid - in Nachbarschaft zur Ketogruppe steht und weil sich das Bromaceton ausreichend in H_2O löst.

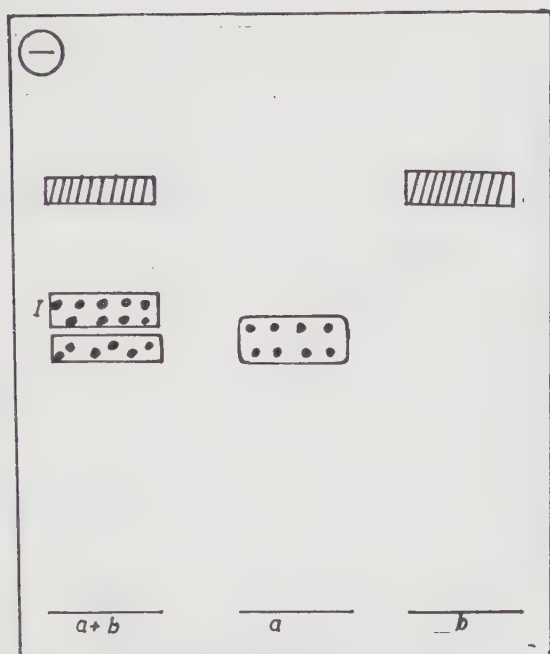


Abb. 5. Pherogramm des Umsetzungsproduktes zwischen Imidazol (b) und 3-Bromactylpyridiniumhydrobromid (a).

..... Gelbfärbung mit Ammoniakdämpfen,

////// Paulyreagenz positiv.

Laufzeit: 45 Minuten; Stromstärke: 30 mAmp.;

Puffer: PH 1,9.

Bromaceton reagierte - wie auch das Hydrobromid - innerhalb von 5 bis 6 Minuten mit Cystein (s.S.62), unterscheidet sich also nicht wesentlich in seiner Reaktionsfähigkeit von der des Hydrobromids gegenüber SH-Gruppen in Modellsubstanzen wie Cystein. Wir setzten nun Bromaceton in hundertfachem Überschuss mit LDH um. (s.S.66 , s.Abb. 6.)

Wie ersichtlich, ergab sich nach 24 Stunden eine 92 prozentige Hemmung. Ein Vergleich mit der Hemmwirkung des Hydrobromids zeigt deutlich die wesentlich schlechtere Hemmwirkung des Bromacetons, die auf Grund seiner ungünstigeren Struktur zu erwarten war.

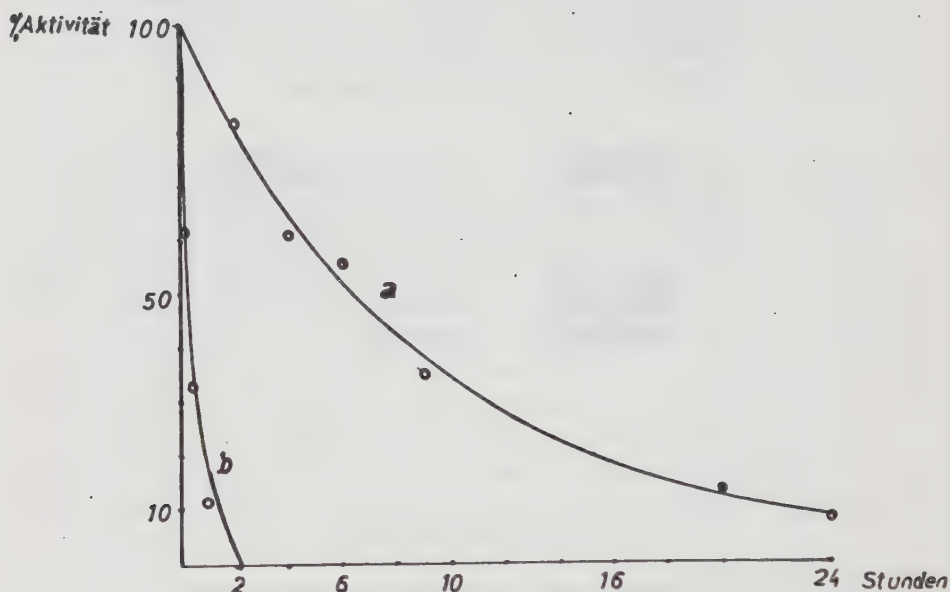


Abb. 6. Hemmung von LDH ($4,15 \times 10^{-5}$ molar) mit Bromaceton ($4,15 \times 10^{-3}$ molar) - Kurve a - und mit 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid (hundertfacher Überschuss gegenüber LDH, Daten s. Abb. 3.) - Kurve b.
 $T = 25^{\circ} \text{C.}$

Dass überhaupt eine Hemmwirkung zustande kam, lag vermutlich daran, dass Bromaceton infolge seiner hohen Konzentration innerhalb von 24 Stunden an das aktive Zentrum herandiffundierte und dort mit den essentiellen SH-Gruppen reagieren konnte.

Schutz der LDH vor dem Angriff von SH-Reagentien mit Na_2SO_3 .

Vor kurzem fand Rajewski, dass bei Behandlung von LDH mit Na_2SO_3 deren essentielle SH-Gruppen gegen den Angriff von Acetanhydrid geschützt wurden und daher keine Hemmung zu beobachten war. (93)
Wir prüften, ob der Schutz durch Na_2SO_3 auch gegen den Angriff

des 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromids wirksam war.

LDH wurde also mit Natriumsulfit umgesetzt. (s.S.65) Es konnte zunächst festgestellt werden, dass eine 40 prozentige reversible Hemmung, die nach Entfernung des Sulfits durch Gelfiltration wieder aufgehoben wird, eintrat. Fügt man nun zu der reversibel gehemmten LDH einen hundertfachen Überschuss an 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid hinzu, so bleibt eine 60 prozentige Restaktivität auch nach 24 Stunden unverändert bestehen. Die Schutzwirkung von Na_2SO_3 konnte also an diesem Beispiel bestätigt werden. Die Ursache ist noch ungeklärt.

II 3 Umsetzung von Maleinimiden mit Cystein und LDH aus Schweineherzen.

Schon seit geraumer Zeit werden in der Arbeitsgruppe G. Pfeleiderer Maleinimide hinsichtlich ihrer Reaktion mit essentiellen SH-Gruppen verschiedener Enzyme, insbesondere der LDH, untersucht. (40, 41, 43, 55) Im Rahmen dieser Untersuchung war mit Ausnahmen festgestellt worden, dass mit Verringerung der Grösse der Maleinimidmoleküle eine Steigerung der Hemmwirkung erzielt werden konnte. (40) Aus den Ergebnissen war folgender Schluss gezogen worden: Die essentiellen SH-Gruppen im aktiven Zentrum der LDH können sich in Hohlräumen befinden, in die nur Moleküle bestimmter Grösse zu gelangen vermögen. Wir untersuchten daher Maleinimide, die sich durch verschieden grosse Substituenten in ihren Molekülradien unterscheiden. Dabei wurde das Ziel verfolgt, Unterschiede in der Hemmwirkung gegenüber LDH, durch die unterschiedliche Grösse der Maleinimide bedingt, herauszuarbeiten, um an Hand der definierten Grössenunterschiede Aussagen über die Ausmasse der postulierten Hohlräume machen zu können.

Die folgenden drei Maleinimide bildeten zunächst den Gegenstand unserer Untersuchungen:

- m-Jodphenylmaleinimid,
- m-Bromphenylmaleinimid und
- m-Chlorphenylmaleinimid.

Da diese Imide schwer löslich in Puffer sind, fügten wir sie in fester Form zu den LDH-Pufferlösungen (s.S. 66 und 68) und nahmen die Reaktionskinetiken der jeweiligen Umsetzungen auf. (s.Abb. 7.)

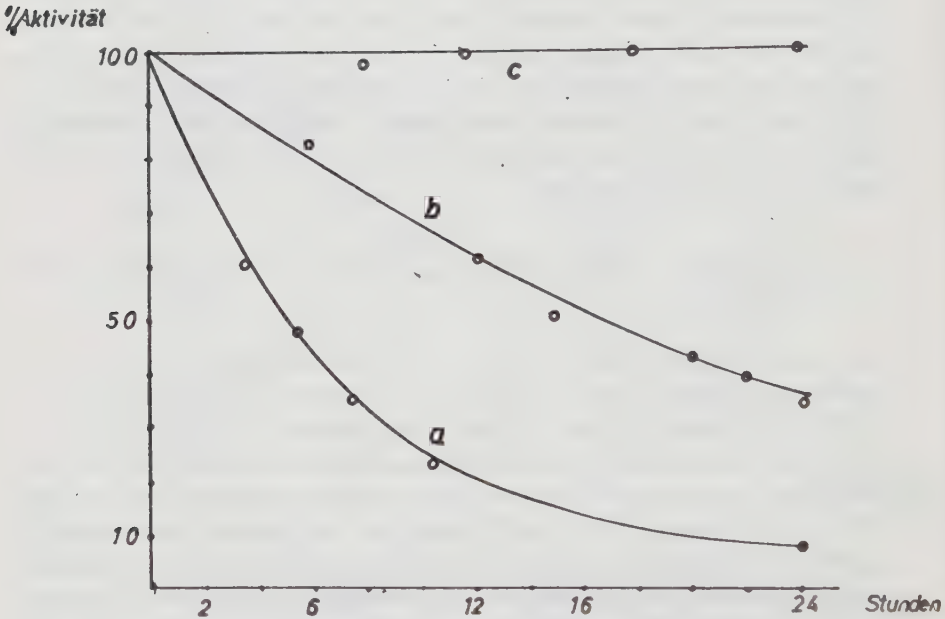


Abb. 7. Hemmung von LDH ($3,2 \times 10^{-5}$ molar) mit m-Jod- (Kurve c), m-Brom- (Kurve b) und m-Chlorphenylmaleinimid (Kurve a).

T = 25 ° C.

Die dargestellten Ergebnisse zeigten zunächst die von uns erwarteten Differenzierungen in der Hemmwirkung gegenüber LDH. Die Vermutung lag jedoch nahe, dass die unterschiedlichen Kinetiken auf Grund der verschiedenen guten Löslichkeit der Maleinimide in Puffer zustande gekommen waren. Wir brachten daher die Maleinimide in einer zehnpromentlichen methanolischen Pufferlösung mit LDH zur Reaktion (s.S. 67,68,69), nachdem wir festgestellt hatten, dass LDH in einer solchen Lösung innerhalb von 24 Stunden voll aktiv bleibt. Die Ergebnisse sind in Abb. 8.

dargestellt.

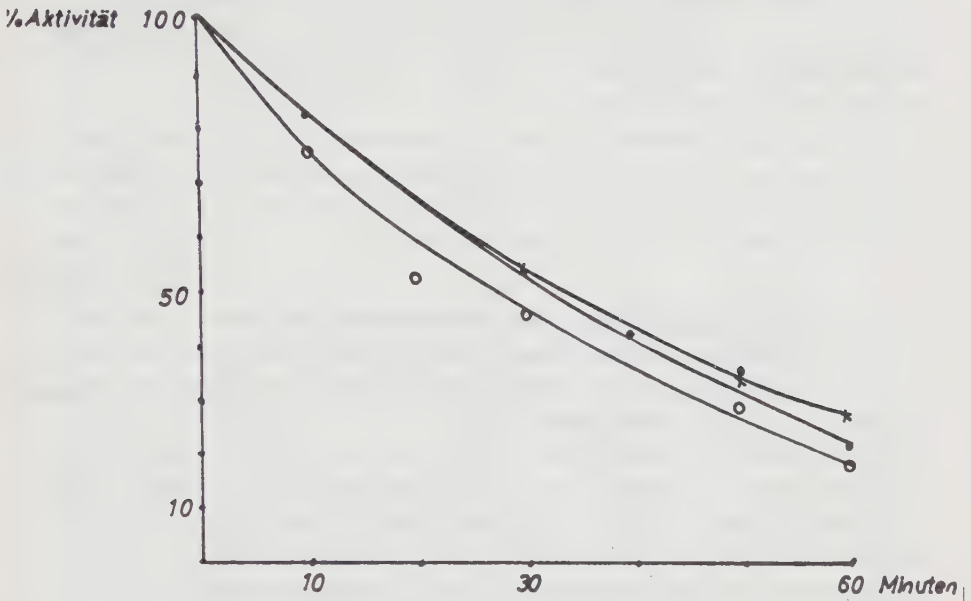


Abb. 8. Hemmung von LDH ($3,2 \times 10^{-5}$ molar) mit m-Jod- (XXX),
m-Brom- (ooo) und m-Chlorphenylmaleinimid (●●●) (je
 $1,5 \times 10^{-3}$ molar).
T = 25 ° C.

Unterschiede in der Hemmwirkung gegenüber LDH konnten - wie aus Abb. 8. ersichtlich - praktisch nicht mehr festgestellt werden. Nach ca. 70 bis 80 Minuten Reaktionszeit beobachteten wir neben einer vollständigen Inaktivierung der LDH bei allen drei Maleinimiden eine Trübung im Reaktionsansatz. Dieser enthielt Maleinimide in fünfzigfachem Überschuss, bezogen auf die in Lösung befindliche LDH. Die Vermutung, dass die in Abb. 7. dargestellten Unterschiede auf die verschiedenen gute Löslichkeit der Maleinimide beruhen, schien sich zu bestätigen. Die unterschiedliche Löslichkeit in Puffer konnte noch durch Extinktionsmessungen bestätigt werden.

Dabei wurden die Absorptionsspektren aus den Überständen der Suspension von Maleinimiden in Puffer nach 24 Stunden aufgenommen und die Extinktion der Maxima ausgemessen. Die Bedingungen gestalteten sich wie auf Seite 70 beschrieben. Wir erhielten für den Überstand der

m-Jodphenylmaleinimidkristallsuspension	:	E	=	0,
m-Brom " " " "	:	E	=	0,54
				(264 mμ)
m-Chlor " " " "	::	E	=	1,47
				(262 mμ)

Da die in Lösung gegangenen Maleinimide nach 24 Stunden in Puffer zu den entsprechenden Säureamiden hydrolysiert waren, wie sich aus pherographischen und chromatographischen Untersuchungen der jeweiligen Überstände ergab (s.o.), sind die bei den Extinktionswerten angegebenen Maxima auf die Spektren der jeweiligen Säureamide bezogen. Ein Vergleich der Extinktionswerte der durch Hydrolyse der Imide in Lösung entstandenen Säureamide und der Reaktionskinetiken in Abb. 7. auf Seite 27 lässt deutlich erkennen, dass das am besten lösliche m-Chlorphenylmaleinimid auch die beste Hemmwirkung zeigt und das am schlechtesten lösliche m-Jodphenylmaleinimid keine Hemmwirkung aufweist.

Um eventuell Differenzierungen bei geringer Maleinimidkonzentrationen aufzufinden, setzten wir die LDH in methanolischer Pufferlösung mit jeweils nur dem zehnfachen Überschuss, bezogen auf die in Lösung befindliche LDH, an Maleinimid um. Es konnte innerhalb von 24 Stunden keine Hemmung festgestellt werden. Über die Grösse der postulierten Hohlräume (siehe Seite 26) konnte mit diesen Untersuchungen keine Aussagen gemacht werden.

Um nun die Vermutung zu stützen, dass solche Hohlräume überhaupt denkbar waren, untersuchten wir das N-(-γ-phenyl-n-butyl-)-maleinimid, das am Imidstickstoff eine aliphatische Kette aus vier C-Atomen und in γ-Stellung einen Phenylkern trägt. Der kleine Imidring konnte in die gedachten Hohlräume bei Anlagerung der Verbindung an die Enzymoberfläche - an einem Stiel gewissermassen - hineinreichen.

Diese Verbindung ist unseres Wissens noch nicht dargestellt worden. Ihre Synthese und Analyse ist auf Seite 53 angegeben.

Umsetzung des N-(- γ -phenyl-n-butyl-)-maleinimids mit Cystein und LDH.

Die Umsetzung des Imids mit Cystein verlief wie bei den anderen untersuchten Maleinimiden vollständig innerhalb von 5 bis 6 Minuten (s.S. 69). Das Maleinimid erwies sich als von den hier behandelten Maleinimiden am schlechtesten löslich, wie noch gezeigt werden soll.

Zur Umsetzung mit LDH suspendierten wir das Imid ebenfalls in fester Form in eine LDH enthaltende Pufferlösung (s.S.69).

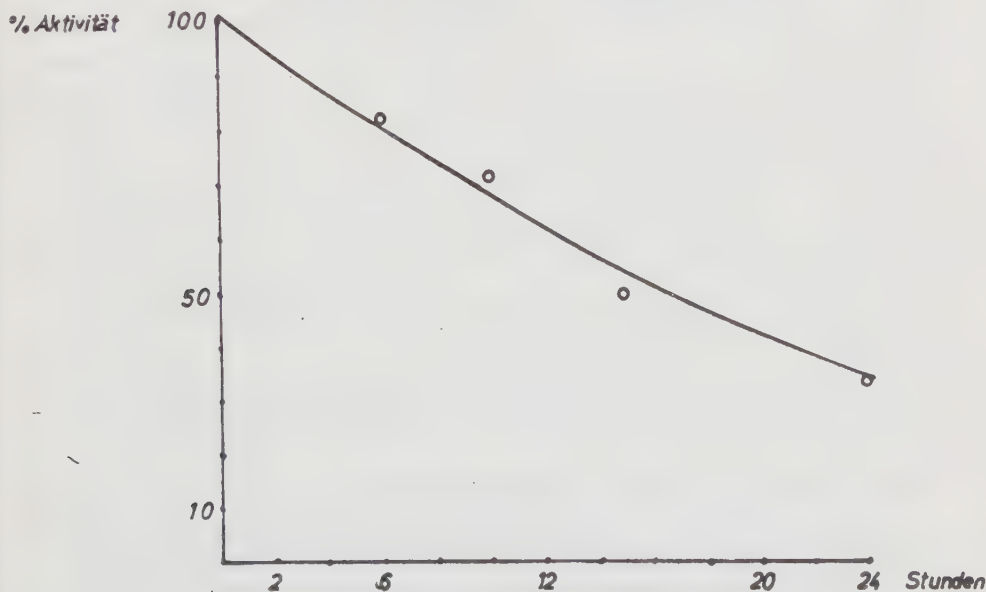


Abb. 9. Hemmung von LDH ($3,2 \times 10^{-5}$ molar) mit N-(- γ -phenyl-n-butyl-)-maleinimid.
T = 25 ° C.

Wir erhielten innerhalb von 24 Stunden eine 66 prozentige Hemmung. Dieses entspricht dem in Abb. 7. dargestellten Ergebnis der Umsetzung von m-Bromphenylmaleinimid in fester Form mit LDH. Dieses Ergebnis bestätigte unsere Erwartungen hinsichtlich der Inhibitorwirkung dieses Maleinimids infolge seiner besonderen Bauart. Das Imid ist nämlich, verglichen mit m-Bromphenylmaleinimid, so schlecht löslich, dass seine Konzentration in Pufferlösung durch spektroskopische Messungen des Extinktionswertes nicht mehr erfasst werden konnte.

Eine ähnlich schlechte Löslichkeit zeigte das m-Jodphenylmaleinimid (s.S.29) und deshalb keine Inhibitorwirkung.

Wir versuchten nun auch, N-(- γ -phenyl-n-butyl-)-maleinimid in einer 10 prozentigen methanolischen Pufferlösung mit LDH zur Reaktion zu bringen (s.S.69). Das Imid wurde in Methanol gelöst und, entsprechend den Versuchen auf den Seiten 67, 68, 69 mit den dort behandelten Maleinimiden, mit LDH-Pufferlösung auf das zehnfache verdünnt. Das Imid fiel jedoch im Gegensatz zu den anderen Maleinimiden infolge seiner Schwerlöslichkeit beim Verdünnen wieder aus. Die Reaktionskinetik der Umsetzung der in fein verteilter Form in der Lösung vorliegenden Verbindung mit LDH wurde aufgenommen (s.Abb. 10.).

Nach 7 Stunden resultierte eine 85 prozentige Hemmung. Nach 24 Stunden war keine Aktivität des Enzyms mehr feststellbar. Die im Gegensatz zur Umsetzung mit dem Imid in fester Form (s.Abb. 9.) bessere Hemmwirkung war vermutlich darauf zurückzuführen, dass infolge der sehr feinen Verteilung dieses Maleinimids im Reaktionsansatz ein guter Kontakt zur Enzymoberfläche möglich wurde.

Die Tabellen I und II geben eine zusammenfassende Übersicht über die Hemmwirkung der untersuchten Reagenzien mit reaktiven Halogenatom und der Maleinimide in fester und gelöster Form gegenüber LDH. Als Mass für die Löslichkeit der Maleinimide in Puffer wurden die gemessenen Extinktionswerte ihrer Hydrolyseprodukte angegeben (s.S. 28 und 29).

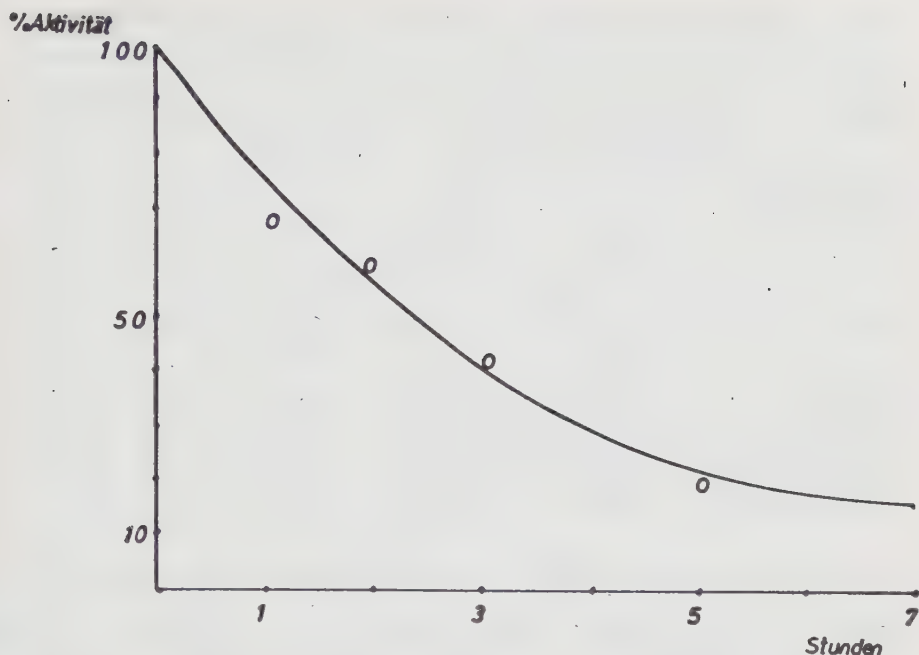


Abb. 10. Hemmung von LDH ($4,15 \times 10^{-5}$ molar) mit N-(γ -phenyl-n-butyl)-maleinimid.

T = 25 ° C.

II 4 Radioaktive Markierung von in LDH eingebautem m-Bromphenylmaleinimid.

Es ist bekannt, dass geeignete Atome durch Bestrahlung mit langsamen Neutronen aktiviert werden können. Wir aktivierten daher Brom in m-Bromphenylmaleinimid durch Neutronenbeschuss (s.S. 54). Der Grund dieser Versuche war es, unter Umgehung mehrstufiger radioaktiver Synthesen m-Brom⁸²phenylmaleinimid zu erhalten oder m-Bromphenylmaleinimid in Protein zu markieren.

Aus dem so erhaltenen radioaktiven Rohprodukt gelang es mit Hilfe eines dünnsschichtchromatographischen Verfahrens (s.S. 55 - 57)

Tab. I Umsetzung von LDH mit Reagentien, die reaktives Brom enthalten, und Maleinimiden in gelöster Form.

Reagenz	mol.Übersch. bez.auf LDH	Inkub.Zeit	Restakt. der LDH in %	Abb. Nr.
Br-Ac-pyridin- hydrobromid	100 fach	120 Min.	1 %	3, 6
"	10 fach	24 Std.	1 %	4
"				
+ Na ₂ SO ₃	100 fach	5 Min.	60 %	
"	100 fach	24 Std.	60 %	
Bromaceton	100 fach	24 Std.	8 %	6
m-J-Ph-mal.Im.	50 fach	60 Min.	27 %	8
m-Br-Ph-mal.Im.	50 fach	60 Min.	19 %	8
m-Cl-Ph-mal.Im.	50 fach	60 Min.	22 %	8

Tab. II Umsetzung von LDH mit Maleinimiden in fester Form.

Reagenz	Einwaage pro ml	Inkub. Zeit	Restakt. der LDH	Extinkt.- Werte	Abb.Nr.
m-J-Ph-mal.Im.	3 mg	24 Std.	100 %	0	7
m-Br-Ph-mal.Im.	2,5 mg	24 Std.	35 %	0,54 (264 m _A)	7
m-Cl-Ph-mal.Im.	2,0 mg	24 Std.	8 %	1,47 (262 m _A)	7
Ph-but-mal.Im.	2,3 mg	24 Std.	34 %	0	9
"					
in MeOH/Puf.		7 Std.	16 %	----	10

m-Brom⁸²phenylmaleinimid mit einer Ausbeute von 20 % Radioaktivität zu isolieren. Die aktivierte Substanz war mit der inaktiven Vergleichssubstanz nach Rf-Wert, Farbreaktion und UV-Absorption auf der Dünnschichtplatte identisch (s.S.51 und Abb. 21). Der Vorteil dieses Verfahrens bestand darin, auf einfache und wirtschaftliche Art und Weise ein radioaktiv markiertes Maleinimid zu erhalten.

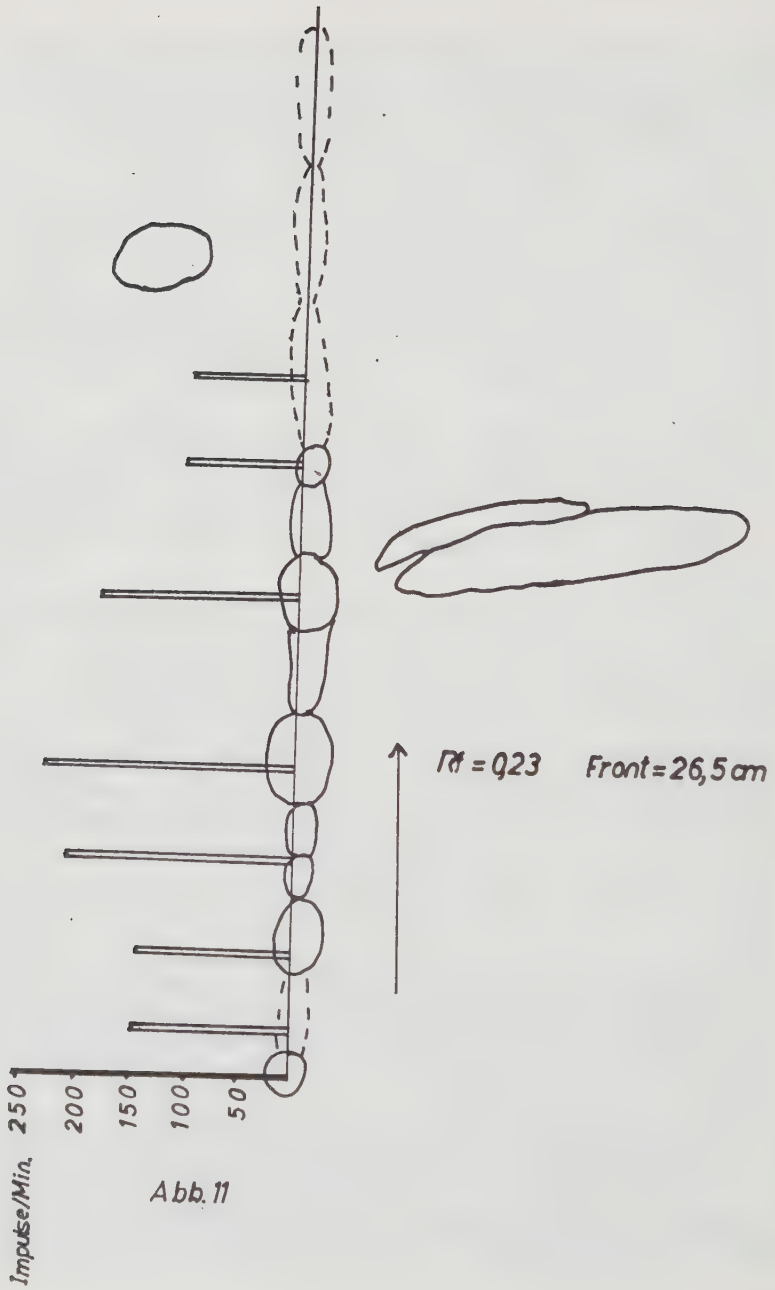
Da die Halbwertszeit von Brom⁸² nur 36 Stunden beträgt, können zeitlich langwierige Untersuchungen über Einbaureaktionen in

Enzymen nicht lange auf radioaktivem Wege verfolgt werden, da die Intensität der Strahlung schnell abnimmt. Wir untersuchten daher die Möglichkeit, das auf Chromatographiepapier aufgetragene radioaktive Imid nach Abklingen seiner Aktivität durch Bestrahlung zu reaktivieren. Jedoch wurden durch die Neutronenbestrahlung die im Papier befindlichen Verunreinigungen ebenfalls angeregt, die teilweise längere Halbwertszeiten (bis zu 14 Tagen) aufwiesen. Das reaktivierte Imid war infolge des stark strahlenden Untergrundes radioaktiv nicht mehr identifizierbar. Analoge Versuche mit Kieselgel, Kieselgel HF₂₅₄ und reinster Cellulose schlugen aus dem gleichen Grunde fehl.

Um diese Schwierigkeiten, die sich aus der Aktivierung von m-Bromphenylmaleinimid auf Papier ergaben, aus dem Wege zu gehen, die Markierungsmethode aber doch für die Verfolgung des Einbaus der Verbindung in LDH nutzbar zu machen, wurde ein anderer Weg beschritten.

LDH reagierte 24 Stunden bei 25 ° C., wie auf Seite 71 beschrieben, mit m-Bromphenylmaleinimid in fester Form. Danach wurde das überschüssige Imid durch Zentrifugation und Gelfiltration vom Protein abgetrennt. Eine anschließende tryptische Verdauung der zu 66 % gehäuteten LDH und lyophilisieren des Hydrolysates führte zu einem Peptidgemisch, dass wir 36 Stunden mit langsamen Neutronen bestrahlten. Von dem radioaktiven Rohprodukt fertigten wir einen Fingerprint an, dessen Technik auf Seite 71 beschrieben wurde. Die bei der Bestrahlung entstandenen radioaktiven Nebenprodukte, die den Hauptteil der radioaktiven Strahlung ausmachten, blieben bei der Chromatographie am Start liegen. Es gelang, ein Aktivitätsmaximum in der Peptidbande mit dem Rf-Wert 0,23 nachzuweisen, woraus geschlossen werden kann, dass sich in dieser Bande die Hauptmenge des eingebauten m-Brom⁸²phenylmaleinimids befindet (s.Abb. 11 und Seite 72).

Da wegen der kurzen Halbwertszeit des Brom⁸² die Strahlung nach der chromatographischen Auftrennung schon weitgehend abgeklungen war, schien die Anfertigung eines Radiogramms nicht sehr erfolgreich. Es wurden daher aus den mit Ninhydrin sichtbar gemachten



Peptidbanden gleich grosse quadratische Plättchen ausgeschnitten und deren Aktivität mit einem Methandurchflusszähler ausgezählt (s. Abb. 11.).

II 5 Bedeutung der Maleinimide für die Aufklärung der Tertiärstruktur der LDH.

Der Einbau von Maleinimiden in LDH, besonders solcher, die schwere Atome wie z.B. Jod tragen (m-Jodphenylmaleinimid), kann hinsichtlich der röntgenographischen Strukturaufklärung dieses Enzyms bedeutsam werden. D.Crowfoot-Hodkins führte in ihrem Nobelvortrag 1965 (54) aus, dass die Struktur von Proteinen röntgenographisch erfasst werden kann, wenn es gelingt, schwere Atome in das betreffende Molekül auf chemischem Wege einzubauen. Die räumliche Struktur des Penicillinmoleküls konnte so auf relativ einfache Art und Weise von Crowfoot-Hodkins et al. durch Einführung eines Bromatoms bestimmt werden.

Jedoch besteht, wie die Autorin weiter ausführte, die Schwierigkeit darin, schwere Atome pro Molekül Protein möglichst im Verhältnis 1 : 1 einzuführen, da eine Bestimmung der Verteilung mehrerer schwerer Atome im Proteinmolekül auf röntgenographischem Wege ausserordentlich schwierig ist. Untersuchungen über die Aufklärung der räumlichen Struktur des Insulins durch Einbau schwerer Atome sind im Gange.

III EXPERIMENTELLER TEIL.

III 1 Synthese von Nucleotiden, Pyridiniumsalzen und Maleinimiden.

III 1 a Darstellung von 6-Mercaptopurinribotid.

Bei der Synthese gingen wir von 6-Mercaptopurinribosid aus, das nach Einführung der Isopropylidengruppe in 2',3'-Stellung (58) in 5'-Stellung phosphoryliert werden konnte. (59, 60, 61)

Beschreibung der Phosphorylierung.

Eine Lösung von 1 g 2',3'-Isopropyliden-6-mercaptopurinribosid in 8,3 ml Pyridin abs. und 20 ml Stammlösung von Cyanoathylphosphat (62) werden bei 30 ° C. zur Trockene eingengt. Zum Rückstand werden 8,3 ml Pyridin abs. gegeben und erneut zur Trockene eingedampft. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Die Einengung erfolgte im Umlaufverdampfer bei Wasserstrahlpumpenvakuum. Anschliessend wird der Rückstand in absolutem Pyridin aufgenommen und mit 6,5 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 24 Stunden werden 17 ml H₂O hinzugegeben und bei 30 ° C. nach halbstündigem Stehen Lösungsmittel und H₂O durch Vakuumdestillation entfernt.

Zum Rückstand werden 150 ml einer 0,4 normalen wässrigen LiOH-Lösung gegeben und eine Stunde am Rückfluss erhitzt. Die Lösung wird gekühlt und filtriert. Filtrat und Waschwasser werden auf eine Dowex 50 H⁺-Säule gegeben. (Sauer gewaschen, Säulendimension 5 x 17 cm.) Es wird mit H₂O bidest. bis zum Verschwinden der Extinktion eluiert. Nun wird auf 50 ml im Vakuum bei 30 ° C. eingengt, mit einer gesättigten Bariumhydroxydlösung auf PH 7,5 eingestellt und sofort abzentrifugiert. Der Überstand wird mit der doppelten Menge Äthanol versetzt und nach zwölfstündigem Stehen bei 0 ° C. abzentrifugiert und getrocknet.

Ausbeute: 2,1 g Bariumsalz des 6-Mercaptopurinribotids.

Reinigung und Isolierung des 6-Mercaptopurinribotids aus dem Bariumsalz.

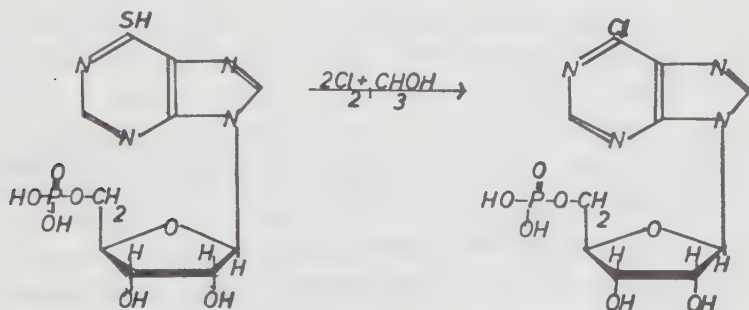
1 g des Bariumsalzes wird in 5 ml H_2O bidest. suspendiert und mit wenig Dowex 50 (s.o.) in Lösung gebracht. Diese Lösung wird auf eine Dowex 50 H^+ -Säule (2 x 30 cm, 60 Mesh) gegeben und mit H_2O bidest.eluiert.

Ausbeute: 350 mg 6-Mercaptopurinribotid, d.s. 62 % der Theorie, bezogen auf 2',3'-Isopropyliden-6-mercaptopurinribosid.

Die Prüfung auf Reinheit wurde pherographisch in m/10 Trispuffer PH 8 vorgenommen. Die phosphathaltige Bande wird nach Besprühen mit Phosphatreagenz (63) durch Bestrahlung mit UV-Licht entwickelt. Das 6-Mercaptopurinribotid hat ein Absorptionsmaximum bei 317 $m\mu$.

III 1 b Darstellung von 6-Chlorpurinribotid.

Wir synthetisierten 6-Chlorpurinribotid durch direkte Chlorierung von 6-Mercaptopurinribotid.



Bei der Ausarbeitung dieses Verfahrens legten wir die Darstellung von Ribosyl-6-chlorpurin aus Ribosyl-6-mercaptopurin zugrunde (64) und wandelten das Verfahren für das vorliegende Problem ab.

100 mg 6-Mercaptopurinribotid (0,00027 Mol) werden in 50 ml abs. Methanol in einem Dreihalskolben suspendiert. Nachdem die

Suspension durch ein Aceton-Trockeneis-Kältebad auf eine Temperatur von -25°C . gebracht worden war, wurde die Chlorierung folgendermassen durchgeführt:

0,3 ml verflüssigtes Chlor (0,0062 Mol) wurden bei Zimmertemperatur mit Hilfe von Stickstoff als Trägergas aus einer weiter unten beschriebenen Apparatur (s.Abb.12.) gasförmig in die auf -25°C . gehaltene Suspension unter heftigem Rühren eingeleitet.

Die Verflüssigung des Chlors war notwendig, um eine genau definierte Chlormenge in das Reaktionsgefäss einzubringen.

Nachdem alles Chlor auf diese Weise zugegeben worden war, wurde die klare methanolische Lösung noch 10 Minuten bei -20°C . unter einem ständigen Stickstoffstrom gerührt. Danach stellten wir mit einer gesättigten methanolischen Ammoniaklösung unter Rühren auf PH 7,5 ein. Die Temperatur wurde dabei auf -20°C . gehalten.

Das Zugeben der Ammoniaklösung erfolgte unter ständigem Stickstoffstrom mit Hilfe eines auf den Dreihalskolben aufgesetzten Druckausgleichstrichters.

Nach der PH-Einstellung wurde eine Lösung von 120 mg Bariumacetat in 10 ml H_2O hinzugegeben und das sofort ausfallende Bariumsalz in einer MSE-Zentrifuge bei 0°C . und 15000 g in 20 Minuten abzentrifugiert.

Anschliessend wurde einmal mit 70 prozentigen Alkohol gewaschen, nochmals zentrifugiert und das Bariumsalz über P_2O_5 im Vakuumexsikkator getrocknet.

Ausbeute: 100 mg des Bariumsalzes als Rohprodukt.

Chlor und Stickstoff wurden vor dem Einleiten in die Reaktionslösung über H_2SO_4 getrocknet.

Die methanolische Ammoniaklösung wurde auf folgendem Wege dargestellt: In mit Eis-Kochsalz gekühltes Methanol abs. wurde solange über KOH getrocknetes Ammoniak eingeleitet, bis das Methanol kein Ammoniak mehr aufnahm.

Bei der Verflüssigung und dem anschliessenden Einleiten des wieder gasförmigen Chlors wurde wie folgt vorgegangen:

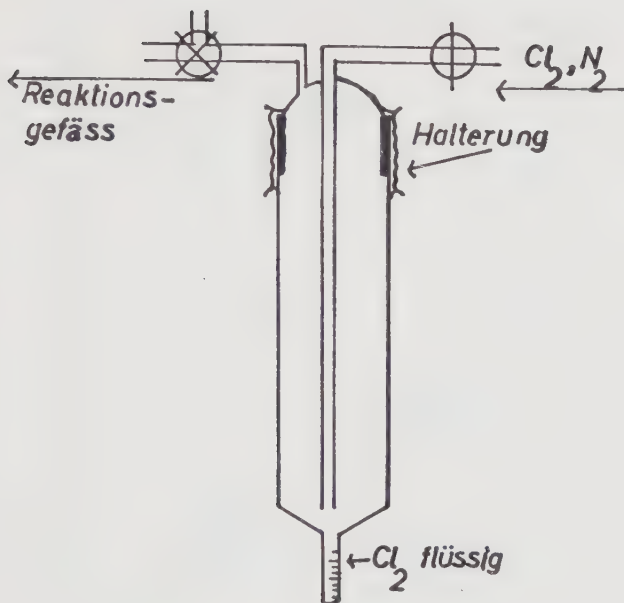


Abb. 12. Schematische Skizze der zur Chlorverflüssigung und -einleitung verwendeten Apparatur.

Das über H_2SO_4 getrocknete Chlorgas wurde in der Apparatur (s. Abb.12.) bei -55°C . verflüssigt. Die verflüssigte Menge wurde in dem kalibrierten Gefrierstutzen aufgefangen. Die Chlorzugabe wurde eingestellt, nachdem die zur Reaktion benötigte Menge (0,3 ml) verflüssigt worden war. Nach Entfernung des Kältebades wurde das Chlor mit einem schwachen Stickstoffstrom in das Reaktionsgefäß eingeblasen.

Das bei der Chlorierung in Form des Bariumsalzes erhaltene Rohprodukt wurde mit etwas Dowex 50 H^+ in Lösung gebracht und pherographiert. (s.Abb.13.)

Das Rohprodukt trennte sich wie ersichtlich in zwei banden, die beide positiv mit Phosphatreagenz (63) reagierten. Als Vergleichssubstanz liessen wir 6-Mercaptopurinribotid mitlaufen.

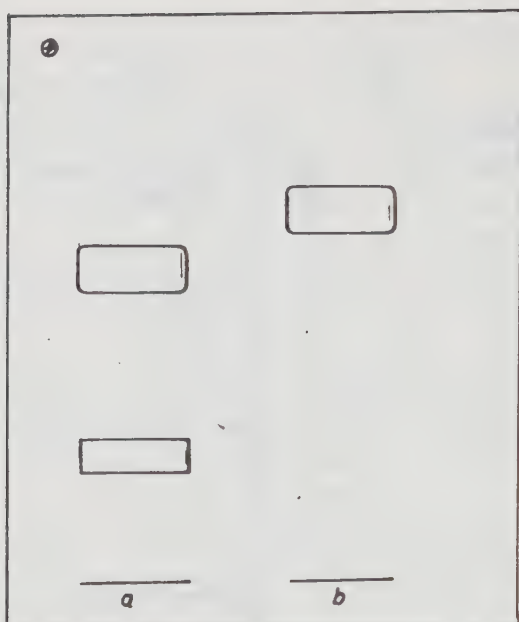


Abb. 13. Pherogramm des nach obiger Darstellung erhaltenen Rohproduktes (a). Vergleichssubstanz: 6-Mercaptopurin-ribotid (b).

m/10 Trispuffer PH 8, 1700 Volt, Laufzeit 60 Min.

Daraus ist ersichtlich, dass der Ausgangsstoff quantitativ umgesetzt worden ist.

Vom gleichen Rohprodukt fertigten wir zur weiteren Reinheitsprüfung ein Dünnschichtchromatogramm auf Cellulose (Schichtdicke 0,375 mm) an. (s.Abb.14.)

Das Rohprodukt zeigt hier eine weitere Bande. Alle drei Substanzen reagierten positiv mit Phosphatreagenz (63) und hatten einen anderen Rf-Wert als die zum Vergleich mitgelaufene Ausgangssubstanz.

Das Absorptionsmaximum des mit etwas Dowex 50 H^+ in Lösung gebrachten oben beschriebenen Bariumsalzes lag bei 263 m μ . Es entspricht dem Absorptionsmaximum des 6-Chlorpurinribotids. (58)

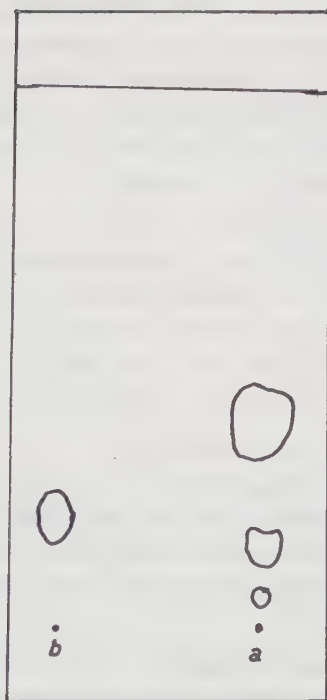


Abb. 14. Dünnschichtchromatogramm des oben dargestellten Rohproduktes, (a) und de als Vergleichssubstanz mitgelaufenen 6-Mercaptopurinribotid (b).
Trägersubstanz: Cellulose, Schicktdicke: 0,375 mm,
Laufmittel: Butanol-Eisessig-Wasser 5 : 3 : 2.

Das Maximum des 6-Mercaptopurinribotids (317 m μ) war vollständig verschwunden (59).

Wir änderten nun die Chlorierungsmethode ab, um die Ausbeute an 6-Chlorpurinribotid auf Kosten der Nebenprodukte zu erhöhen.

8 ml Methanol abs. wurden in einem Dreihalskolben auf -20 ° C. gebracht und unter heftigem Rühren 1 g 6-Mercaptopurinribotid (0,0027 Mol) darin suspendiert. Hierzu wurden 0,35 ml an HCl gesättigten Methanol gegeben (64), die in Eis-Kochsalz vor-

gekühlt worden waren. Nun wurden unter gleichen Bedingungen, wie auf Seite 39 angegeben, 0,58 ml verflüssigtes Chlor (0,012 Mol) gasförmig in die Reaktionslösung eingeleitet. Nachdem alles Chlor in die Reaktionslösung eingebracht worden war, wurde das Methanol bei -20°C . Kühlflüssigkeitstemperatur im Vakuum bei 3 Torr im Umlaufverdampfer abdestilliert. Die Lösung wurde während des Destillationsvorganges mit Eis gekühlt.

Das zurückbleibende gelbe Öl wurde mit vorgekühltem Aceton versetzt und über Nacht in der Tiefkühltruhe (-70°C .) aufbewahrt. Danach wurde das Aceton abdekantiert, die hellgelbe feste Substanz in 0,5 ml H_2O gelöst und wieder mit 100 ml kaltem Aceton gefällt. Nach Stehen über Nacht in der Kälte wurde abgesaugt. Es resultierte ein hellgelbes wasserlösliches Produkt.

Ausbeute: 167 mg.

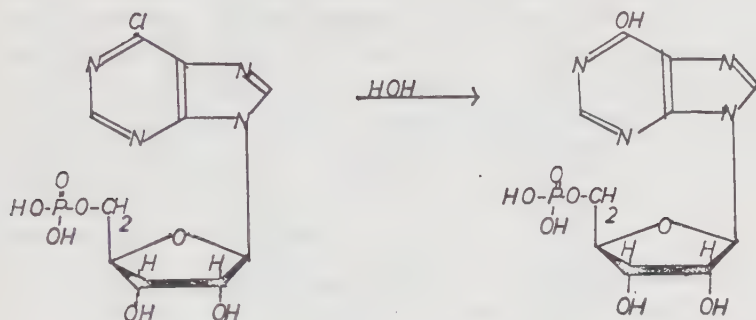
Das Dünnschichtchromatogramm zeigte, dass der Versuch, die Ausbeute zu erhöhen, fehlgeschlagen war. Eine Identifizierung des 6-Chlorpurinribotids war nicht möglich, da nach Elution der einzelnen Banden das gesuchte Absorptionsmaximum nicht aufzufinden war. (s. Abb. 15.)

Für die folgenden Isolierungsversuche von 6-Chlorpurinribotid wurde das nach dem auf Seite 39 beschriebenen Verfahren gewonnene Bariumsalz verwandt. Die Reindarstellung des 6-Chlorpurinribotids aus dem Bariumsalz wurde zunächst über Dowex 50 H^+ versucht.

1 g Bariumsalz wurde auf eine Dowex 50 H^+ -Säule (2 x 30 cm) gegeben und mit H_2O bidest. eluiert. Nach Gefriertrocknen der aufgefangenen Fraktionen erhielten wir entweder ein Produkt, das nach Absorptionsmaximum und Pherogramm dem Inosin-5'-monophosphat entsprach (65), oder Produkte, die nach Lage ihres Absorptionsmaximums nicht dem gesuchten 6-Chlorpurinribotid entsprachen. Auch Trennversuche an einer Dowex 50 H^+ -Säule, die in einer Kühlzelle auf eine Temperatur zwischen 0 und $+2^{\circ}\text{C}$. gebracht worden war, schlugen fehl.

Die Vermutung lag nahe, dass schon ein Teil des im aufgegebenen Bariumsalz enthaltenen 6-Chlorpurinribotid auf der Säule, kata-

lysiert durch Dowex 50 H^+ zu Inosinmonophosphat hydrolisiert.



Wir brachten daher eine Probe des Bariumsalzes mit Dowex 50 H^+ in Lösung und liessen einige Zeit stehen. Von Zeit zu Zeit nahmen wir Absorptionsspektren auf, und stellten fest, dass sich das Spektrum des Bariumsalzes innerhalb von 2 Stunden vollständig von 263 $m\mu$ - entsprechend dem 6-Chlorpurinribotid - nach 247 $m\mu$ - entsprechend dem Hydrolysat - verschoben hatte (65).

Dowex 50 H^+ erwies sich also als Säulenmaterial zur Isolierung von 6-Chlorpurinribotid aus dem Bariumsalz als ungeeignet.

Weitere Trennversuche über Amberlite IRC 50, Dowex 50 Na^+ und Dowex 1 Cl^- hatten keinen Erfolg, da keine Auftrennung der durch die Chlorierung erhaltenen Rohprodukte zu erzielen war.

In Anlehnung an das Trennverfahren von 6-Chlorpurinribotid und Inosinsäure von A.Hampton et al. (58) über Cellulose, gelang uns die Isolierung des 6-Chlorpurinribotids aus dem bei der Chlorierung des 6-Mercaptopurinribotids entstandenen Gemisch'.

Auf eine Cellulosesäule (Eteola, 5,5 x 31 cm) wurde eine Lösung von 500 mg des nach dem Verfahren auf Seite 39 erhaltenen Bariumsalzes in 8 ml des Elutionsmittels (Butanol-Eisessig- H_2O 5 : 3 : 2) aufgegeben. Die Säule war vorher in einer Kühlzelle, ebenso wie die Elutionslösung, auf 3 ° C. gekühlt worden.

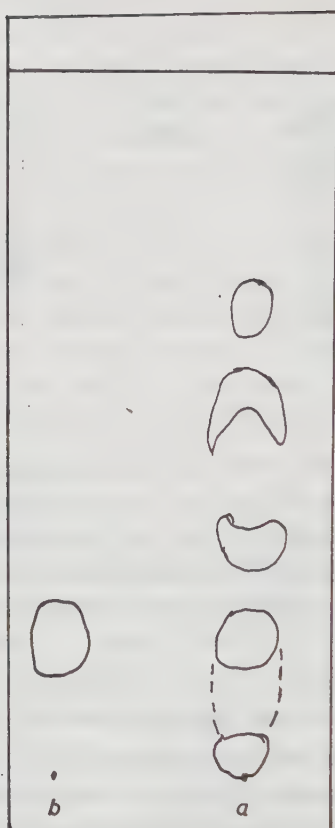


Abb. 15. Dünnschichtchromatogramm des auf Seite 43 beschriebenen Rohproduktes (a). Vergleichssubstanz: 6-Mercaptopurinribotid (b).

Bedingungen siehe Abb.14., Seite 42.

Das Bariumsalz hatte sich jedoch schon in dem Elutionsmittel nicht sehr gut aufgelöst, es blieb eine gummiartige, klebrige Masse zurück.

Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute erschien nach 700 ml das 6-Chlorpurinribotid, wie sich aus dem Absorptionsspektrum des Eluats ergab ($E_{\max} = 263 \text{ m}\mu$).

Das Eluat wurde nun gefriergetrocknet, Wir erhielten ein Produkt, das sowohl auf dem Pherogramm (m/10 Trispuffer PH 8) als auch auf dem Dünnschichtchromatogramm (Cellulose, Schichtdicke 0,375 mm, Laufmittel: Butanol-Eisessig-H₂O 5 : 3 : 2) einheitlich war. Der R_f-Wert betrug 0,35. Dieser Wert steht in Übereinstimmung mit dem von A.Hampton et al. gefundenen Wert für 6-Chlorpurinribotid (66). Das Absorptionsmaximum des isolierten Produktes lag bei 263 m μ (58).

Der Chlornachweis war positiv.

Die Ribose(67)-Phosphatbestimmung (68) ergab ein Verhältnis von 1 : 1. Da die Ausbeute zu gering war, konnte eine Gesamtanalyse nicht durchgeführt werden.

Von dem isolierten 6-Chlorpurinribotid wurde ein IR-Spektrum aufgenommen, (s.Abb.16.).

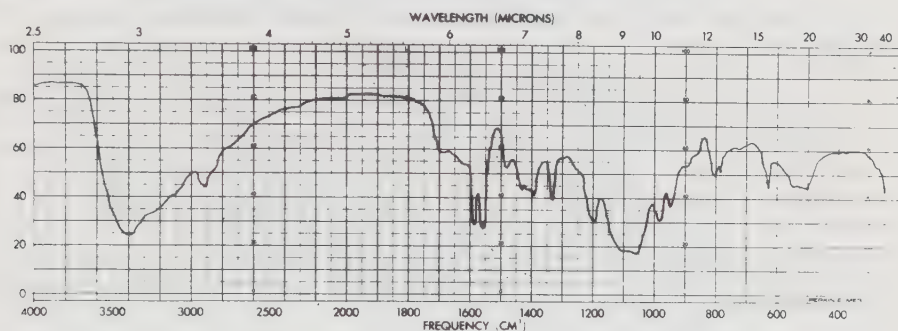
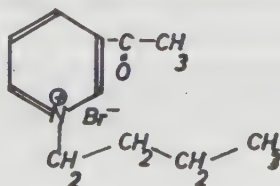


Abb. 16. IR-Spektrum des 6-Chlorpurinribotids.

2 mg 6-Chlorpurinribotid : 200 mg KBr.

III 1 c Darstellung von N-(n-butyl-3-acetylpyridinium)-bromid.



13,7 g Butylbromid (0,1 Mol) und 12,1 g 3-Acetylpyridin (0,1 Mol) wurden gemischt. Nach 48 stündigem Stehen bei 30 ° C. wurde das hellgelbe Pyridiniumsalz abgesaugt.

Die Reinigung bereitete erhebliche Schwierigkeiten, da das Salz aus den zur Umkristallisation verwendeten Lösungsmitteln entweder nicht mehr auskristallisierte oder aber sich als langsam erstarrendes Öl abschied. Die Reinigung wurde daher durch Auswaschen mit Aceton vorgenommen. Es wurde solange mit Aceton gewaschen, bis die Waschflüssigkeit keine Gelbfärbung mehr zeigte.

Ausbeute: 2,2 g, d.s. 8 % der Theorie, bezogen auf das Acetylpyridin.

Schmelzpunkt 136 - 138 ° C.

Analyse: Berechnet: 51,20 % C, 6,20 % H, 5,42 % N, 30,90 % Br,
gefunden: 50,94 % C, 6,28 % H, 5,84 % N, 30,65 % Br.

Diese Substanz ist unseres Wissens nach in der Literatur noch nicht beschrieben.

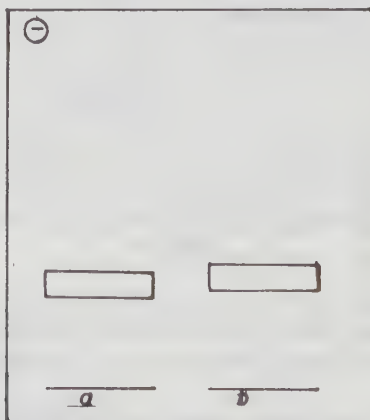


Abb. 17. Pherogramm des N-(n-butyl-3-acetylpyridinium)-bromids (a) und des N-(n-butyl nikotinamid)-jodids (b).
m/10 Trispuffer PH 8, Laufzeit 35 Min., Stromst. 30 mAmp.
Die Banden zeigen nach mehrstündiger Behandlung mit
Butanon-Ammoniak-Dämpfen hellgelbe Fluoreszenz. (72)

Das N-(n-butyl-3-acetylpyridinium)-bromid reagierte erwartungsgemäss - wie aus dem UV-Spektrum in Abb. 18. ersichtlich - mit KCN in Parastellung unter Ausbildung einer chinoiden Struktur (71).

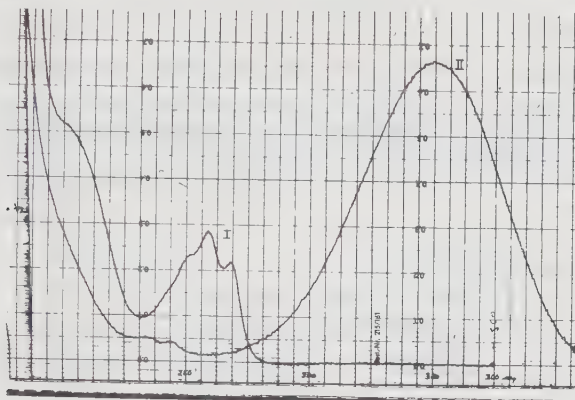


Abb. 18. UV-Spektrum von N-(n-butyl-3-acetylpyridinium)-bromid I (Konzentration $2,5 \times 10^{-5}$ molar) und von N-(n-butyl-3-acetyl-4-cyanopyridinium)-bromid II.

Die Konzentration von KCN in der Kuvette betrug 1/10 m.

III 1 d Reinigung von 3-Brom-acetylpyridiniumhydrobromid (77, 78).

Das nach A.Dornow et al. (77) dargestellte 3-Brom-acetylpyridiniumhydrobromid reinigten wir in Abänderung des angegebenen Verfahrens wie folgt:

Das Hydrobromid wurde in der Wärme in Methanol aufgelöst, nach dem Erkalten mit Aceton ausgefällt und über Nacht in der Kälte stehen gelassen.

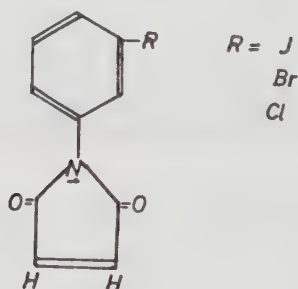
Farblose Nadeln.

Schmelzpunkt: 196°C .

Das Hydrobromid wurde pherographisch in Puffer PH 1,9 auf seine Reinheit geprüft. Die Substanzbande ist im UV-Licht auf dem Papier deutlich sichtbar.

Auf der Suche nach einem Reagenz zur Entwicklung des Substanz auf dem Papier kam uns die Beobachtung zustatten, dass sich das Hydrobromid beim Behandeln mit Ammoniak gelb färbt, was wahrscheinlich auf eine Polymerisation der in Freiheit gesetzten Base zurückzuführen ist.

Da die Vorschriften für die in diesem Abschnitt behandelten Maleinimide in der Literatur nur in stark gekürzter Form vorlagen (Patente und Chemical Abstracts), mussten die Verfahren neu erarbeitet werden. Es wurde im Prinzip analog gearbeitet (83, 87).



III 1 e Darstellung von m-Jodphenylmaleinimid.

Synthese des m-Jodphenylmaleinamids.

4,38 g m-Jodanilin (0,02 Mol) werden in 20 ml Äther gelöst und bei $-3^{\circ}C$. unter Rühren mit einer Lösung von 1,96 g Maleinsäureanhydrid (0,02 Mol) in 40 ml Äther versetzt. Die Temperatur soll nicht über $0^{\circ}C$. ansteigen. Nachdem alles Maleinsäureanhydrid zugegeben worden ist, rührt man noch 30 Minuten und lässt bei Zimmertemperatur über Nacht stehen.

Ausbeute: 4 g, d.s. 63 % der Theorie,
Schmelzpunkt: $175 - 176^{\circ}C$. (Butanol).

Darstellung des Imids.

3,17 g Amid (0,01 Mol) werden mit 20 g Acetanhydrid und 800 mg Natriumacetat 15 Minuten auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Abkühlen

wird auf Eis gegossen und bis zur Zersetzung des Anhydrids gerührt. Das ausfallende Produkt wird abgesaugt, mit H_2O gewaschen und aus Benzol umkristallisiert.

Ausbeute: 2,4 g, d.s. 80 % der Theorie.

Hellgelbe Blättchen (Benzol),

Schmelzpunkt: 168 - 169 ° C.

III 1 f Darstellung von m-Chlorphenylmaleinimid (84, 85).

Synthese des Säureamids.

12,7 g m-Chloranilin (0,1 Mol) werden in 20 ml Äther gelöst und dazu unter Rühren bei 0 ° C. 9,8 g Maleinsäureanhydrid (0,1 Mol) in 100 ml Äther gegeben. Die Temperatur soll nicht über 0 ° C. ansteigen. Man rührt noch 30 Minuten in der Kälte und lässt über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Es wird aus Butanol umkristallisiert.

Ausbeute: 12 g, d.s. 53 % der Theorie.

Schmelzpunkt: 193 - 194 ° C.

Darstellung des Imids.

6,7 g des Säureamids (0,029 Mol) werden mit 50 g Acetanhydrid und 1 g Natriumacetat auf dem Wasserbad bis zum vollständigen Lösen erwärmt. Man erhitzt noch 15 Minuten weiter und giesst nach dem Abkühlen unter Rühren auf Eis. Man rührt solange weiter, bis sich das überschüssige Anhydrid zersetzt hat. Das ausgefallene Produkt wird mit H_2O gewaschen und aus Cyclohexan umkristallisiert.

Ausbeute: 3 g, d.s. 48 % der Theorie.

Hellgelbe Nadeln (Cyclohexan).

Schmelzpunkt: 90 - 91 ° C.

III 1 g Darstellung von m-Bromphenylmaleinimid (85, 86).

Synthese von m-Bromphenylmaleinamid.

Zu einer Lösung von 5,7 g m-Bromanilin (0,33 Mol) in 30 ml Äther werden unter Rühren 3,3 g Maleinsäureanhydrid (0,33 Mol) in 60 ml Äther hinzugegeben. Man rührt noch 10 Minuten in der

Kälte weiter und lässt einige Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Das ausgefallene Amid wird abgesaugt und mit eiskaltem Äther gewaschen. Man kristallisiert aus Butanol um.

Ausbeute: 8 g, d.s. 90 % der Theorie.

Schmelzpunkt: 182 - 183 ° C.

Darstellung des Imids.

7 g des Säureamids (0,026 Mol) werden mit 40 g Acetanhydrid und 800 mg Natriumacetat auf dem Wasserbad erwärmt, bis sich alles gelöst hat. Man erhitzt noch weitere 10 Minuten und giesst nach dem Abkühlen auf Eis. Es wird solange gerührt, bis sich das überschüssige Anhydrid zersetzt hat. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt und mit H₂O gewaschen. Es wird aus Cyclohexan umkristallisiert.

Ausbeute: 4 g, d.s. 60 % der Theorie.

Hellgelbe Blättchen (Cyclohexan),

Schmelzpunkt: 129 - 130 ° C.

Die Reinheitsprüfung der dargestellten Säureamide erfolgte photographisch, (m/10 Trispuffer PH 8, Hochspannungselektrophorese). Die Imide dagegen wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie mit einem hierfür entwickelten Eluentensystem auf Einheitlichkeit getestet.

Als Sorptionsmittel verwandten wir Kieselgel HF₂₅₄. Dieses brachte neben der Möglichkeit, die aufgetragenen Maleinimide im UV-Licht sichtbar zu machen, noch den Vorteil, dass sich die Imide auf der Platte nach einiger Zeit bei Luftzutritt rotbraun färbten und so sichtbar wurden. Diese Beobachtung hatten wir mit verschiedenen Maleinimiden sowohl bei Verwendung von Kieselgel G als auch von Kieselgel HF₂₅₄ gemacht. Es handelt sich hier vermutlich um eine Polymerisationsreaktion. Bei den Säureamiden tritt diese Erscheinung nicht auf, was durch die Aktivierung der Doppelbindung bei den Imiden verständlich wird.

Als günstigstes Laufmittel erwies sich eine Mischung von Benzol und Methanol im Verhältnis 50 zu 0,6 (v/v). Es empfiehlt sich, die Eluentenmischung stets frisch anzusetzen, da infolge des geringen Methanolgehaltes die R_f-Werte durch geringfügige Ver-

dunstung sehr stark geändert werden.

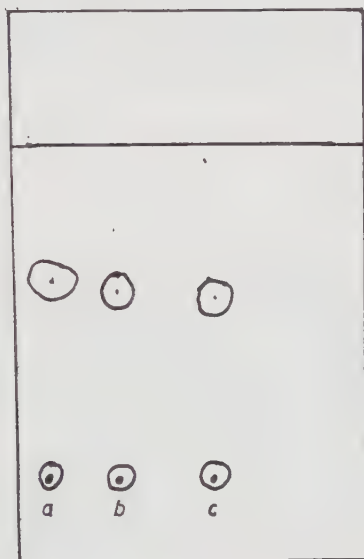
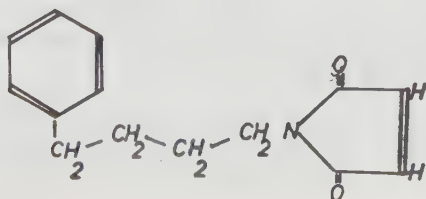


Abb. 19. Dünnschichtchromatogramm von m-Jod- (a), m-Brom- (b), m-Chlorphenylmaleinimid (c) und den entsprechenden Säureamiden.

Kieselgel HF₂₅₄, Schichtdicke 0,375 mm, Eluent: Benzol und Methanol im Verhältnis 50 zu 0,6 (v/v).

III 1 h Darstellung von N-(γ -Phenyl-n-butyl)-maleinimid.



Synthese des Säureamids.

Eine Lösung von 980 mg Maleinsäureanhydrid (0,01 Mol) in 60 ml Äther wird auf -10°C . gekühlt und unter Rühren mit 1,49 g Phenyl-n-butylamin (0,01 Mol) versetzt. Es wird noch 2 Stunden in der Kälte gerührt, wobei farblose Kristalle ausfallen. Man lässt 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, saugt ab und wäscht mit eiskaltem Äther nach. Es wird aus Benzol umkristallisiert.

Ausbeute: 1 g, d.s. 40 % der Theorie.

Schmelzpunkt: $90 - 92^{\circ}\text{C}$.

Darstellung des Imids.

1 g des Säureamids (0,004 Mol) werden mit 60 ml Acetanhydrid und 800 mg Natriumacetat eine Stunde auf dem siedenden Wasserbad erwärmt. Das überschüssige Acetanhydrid wird im Vakuum bei 50°C . verdampft und der ölige Rückstand über P_2O_5 und KOH im Vakuumexsikkator getrocknet. Das teilweise erstarrende Öl wird in 5 ml eines Gemisches von Benzol und Methanol (100 zu 1,2 v/v) aufgenommen, vom unlöslichen Rückstand abfiltriert und im Vakuum bei 25°C . auf 2 ml eingeeengt. Nun werden jeweils 0,5 ml der Lösung auf Dickschichtplatten (Kieselgel HF_{254} , Schichtdicke 1,5 mm) aufgetragen. Als Laufmittel wird wieder das Benzol-Methanol-Gemisch (50 zu 0,6 v/v) verwendet. Die Maleinimidbande wird mit Aceton eluiert. Das Eluat wird vom Kieselgel abgesaugt (Glasfritte G 4). Das Lösungsmittel wird bei 25°C . im Vakuum abdestilliert. Das zurückbleibende Imid wird aus abs. n-Butanol umkristallisiert.

Ausbeute: 110 mg, d.s. 12 % der Theorie.

Schmelzpunkt: $57 - 59^{\circ}\text{C}$.

Farblose Nadeln (n-Butanol abs.),

Rf-Wert: 0,62 (Dünnschichtchromatogramm: Kieselgel HF_{254} , Schichtdicke: 0,375 mm, Eluentenmischung: Benzol - Methanol 100 : 1,2 (v/v)).

Analyse:

Berechnet (nach Gysell):	73,34 % C,	6,59 % H,	6,11 % N,
gefunden:	73,28 % C,	6,46 % H,	6,33 % N.

Dieses Imid ist unseres Wissens nach noch nicht dargestellt worden.

III 2 Aktivierung von Brom in Maleinimiden.

III 2 a Darstellung und Isolierung von m-Brom⁸²phenylmaleinimid durch Bestrahlung von m-Bromphenylmaleinimid mit lang- samen Neutronen.

Von dem auf Seite 50 beschriebenen m-Bromphenylmaleinimid wurde 1 mg in ein Quarzröhrchen eingewogen, zugeschmolzen und in eine PVC-Hülle eingeschweisst. Die so verpackte Probe wurde in eine Aluminiumkapsel gegeben und 36 Stunden einem Neutronenfluss von 2×10^{11} n/cm² x sec. ausgesetzt. Die Aktivität des erhaltenen Bestrahlungsproduktes betrug 50 μ Curie. Das folgende Radiogramm zeigt die Auftrennung des bei der Bestrahlung erhaltenen Rohproduktes auf einer Dünnschichtplatte (s. Abb. 20.).

Auf dem Radiogramm erkennt man deutlich ausser den durch die Bestrahlung entstandenen Nebenprodukten die Lage des gewünschten Produktes (also m-Brom⁸²phenylmaleinimid) an Hand der Lage der inaktiven Vergleichssubstanz.

Die UV-Absorption und die schon beschriebenen Verfärbungen (s. S. 51) stimmen mit der Lage der radioaktiven Substanz überein. Die inaktive Vergleichssubstanz läuft identisch.

Eine Reinigung des m-Brom⁸²phenylmaleinimids durch Umkristallisieren war nicht zu erreichen. Wir isolierten die radioaktive Substanz daher auf chromatographischem Wege.

1 mg des radioaktiven Rohproduktes wurde auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel HF₂₅₄, Schichtdicke: 0,375 mm) nach dem Auflösen in der Eluentenmischung (Benzol - Methanol wie 50 zu 0,6 v/v) mit einer feinen Pipette aufgetragen, (0,3 ml) und entsprechend Abb. 20. aufgetrennt. Die durch die Lage der inaktiven Vergleichssubstanz identifizierte m-Brom⁸²phenylmaleinimidbande wurde aus der Dünnschichtplatte herausgetrennt und mit 0,3 ml des Laufmittels in einem mit Glasstopfen verschlossenen Gläschen

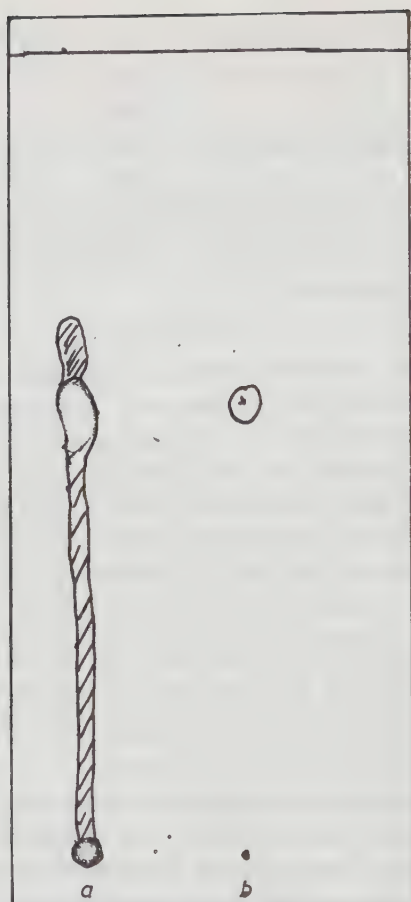


Abb. 20. Dünnschichtchromatogramm/Radiogramm des bei der Bestrahlung des m-Bromphenylmaleinimids erhaltenen Rohproduktes (a) und des inaktiven m-Bromphenylmaleinimids (b) als Vergleichssubstanz.

Bedingungen für das Dünnschichtchromatogramm wie bei Abb. 19.

Das Photopapier wurde zur Aufnahme des Radiogramms 48 Stunden der Strahlung ausgesetzt.

2 - 3 Minuten geschüttelt. Die Lösung wurde dann mit einer Spritze aufgenommen und durch eine kleine Glasfritte (Nr. G 4) abgesaugt, um das noch vorhandene Sorptionsmaterial vollständig aus der Lösung zu entfernen. Nachdem das Lösungsmittel bei Zimmertemperatur verdunstet war, was in einer Kristallisierschale innerhalb weniger Minuten vor sich ging, wurde das zurückbleibende radioaktive Imid wieder in Benzol - Methanol aufgenommen und rechromatographiert. Das m-Brom⁸²phenylmaleinimid war sowohl im UV-Licht als auch nach Verfärbung und Radioaktivität einheitlich. Das isolierte radioaktive Imid lief identisch mit dem inaktiven.

Ausbeute: 20 % Radioaktivität.

Rf-Wert: 0,62 (s.Abb. 21.).

Da die Halbwertszeit von Brom⁸² nur 36 Stunden beträgt, versuchten wir das auf dem Papier aufgetragene m-Brom⁸²phenylmaleinimid durch Neutronenbestrahlung zu reaktivieren. Die Bestrahlung wurde unter den schon beschriebenen Bedingungen ausgeführt.

Die Verunreinigungen im Papier wurden jedoch ebenfalls durch die Neutronenbestrahlung so stark angeregt, dass die Lage des reaktivierten Imids nicht mehr bestimmt werden konnte.

Auf der Suche nach einem Material, das diese störende Eigenschaft infolge von Verunreinigungen nicht aufwies, setzten wir reinstes Cellulosepulver, Kieselgel G und Kieselgel HF₂₅₄ der Neutronenbestrahlung aus. Jedoch erwiesen sich auch diese Materialien aus dem oben erwähnten Grunde (zu starke Eigenstrahlung und zu lange Halbwertszeiten) als ungeeignet.

III 2 b Neutronenbeschuss von p-Bromphenylmaleinimid.

Das analog dem Verfahren auf Seite 50 dargestellte Imid (88, 89) wurde unter den gleichen Bedingungen wie m-Bromphenylmaleinimid mit Neutronen bestrahlt. Die Aktivität des Rohproduktes (eingesetzte Menge 1 mg) betrug ebenfalls 50 μ Curie. Das Radiogramm (s.Abb. 22.) zeigt eine Auftrennung des bestrahlten Produktes auf einer Dünnschichtplatte.

Da jedoch das inaktive p-Bromphenylmaleinimid nicht so lange

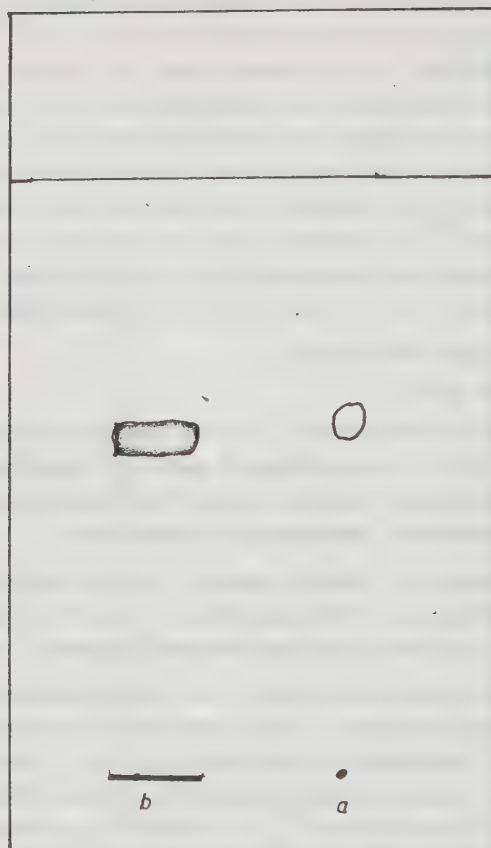


Abb. 21. Dünnschichtchromatogramm/Radiogramm des m-Brom⁸²phenylmaleinimids (b) und des inaktiven m-Bromphenylmaleinimids (a) als Vergleichssubstanz.
Bedingungen siehe Abb. 20.

stabil ist wie die m-Verbindung, war es für unsere Zwecke nicht sehr geeignet. Auf eine Isolierung des p-Brom⁸²phenylmaleinimids wurde daher verzichtet.

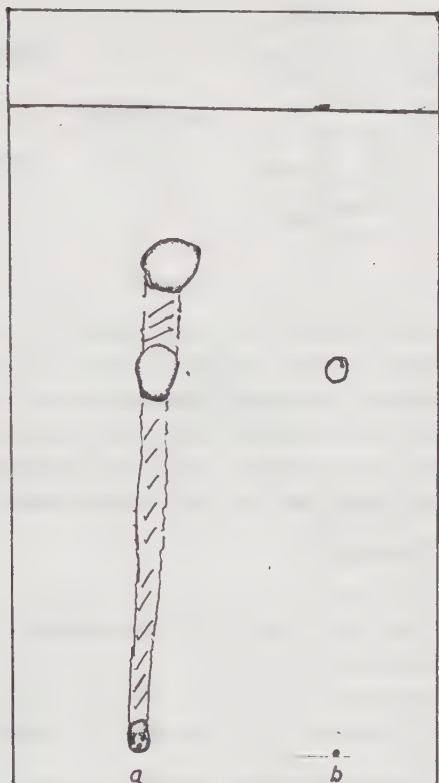
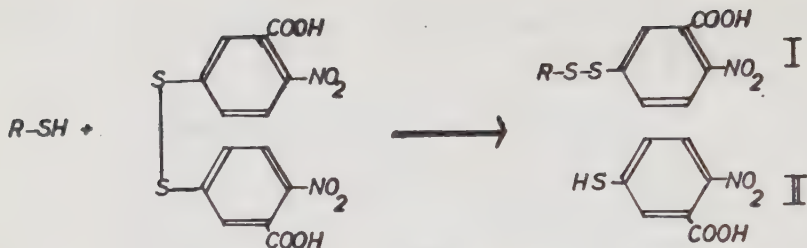


Abb. 22. Dünnschichtchromatogramm/Radiogramm des bei der Bestrahlung des p-Bromphenylmaleinimids (b) entstandenen Rohproduktes (a).
Bedingungen siehe Abb. 20.

III 3 Messungen.

III 3 a SH-Gruppenbestimmung mit 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB). (90)

Die SH-Gruppenbestimmung mit DTNB beruht auf folgendem Reaktionsschema:



Die Intensität der Färbung der Verbindung II wird bei $412\text{ m}\mu$ gemessen. Wir nahmen zunächst eine Eichkurve auf. Hierbei wurden an verschiedenen, bekannten Cysteininkonzentrationen nach jeweiliger Reaktion der SH-Gruppe mit DTNB die Extinktionswerte gemessen. Die Messungen wurden an einem Quarz-Spektralphotometer von der Firma Zeiss bei $412\text{ m}\mu$ vorgenommen.

Ausführung der Messungen.

Die Messküvette enthielt:

0,2 ml DTNB (10 mg pro 5 mg m/15 Sörensenpuffer PH 7,1),

2,8 ml Puffer (s.o.) und

0,00x ml Cysteinlösung ($x = 1 - 10$).

Die Cysteinlösung wurde so angesetzt, dass 1 ml jeweils 10^{-8} Mol enthält.

Die Vergleichsküvette enthielt 0,2 ml DTNB-Lösung (s.o.) und 2,8 ml Puffer (s.o.). Siehe Abb. 23.

Die Cysteinlösung wurde mit Hilfe einer Mikroliterspritze der Firma Hamilton in die Messküvette gegeben. Die Fehlergrenze dieser Methode ist $\langle \pm 5\% \rangle$ (Messung nach 5 Min. Reaktionszeit.)

III 3 b Reinigung der LDH aus Schweineherzen.

6 ml einer LDH (Lactatdehydrogenase) Kristallsuspension (10 mg pro ml) wurden bei 0°C . und 17000 g in einer MSE- Zentrifuge 70 Minuten zentrifugiert. Der Niederschlag wurde dann in 2 ml m/15 Sörensenpuffer PH 7,1 aufgenommen und dann in der Kühlzelle bei 3°C . gegen diesen Puffer dialysiert. Der Puffer wurde

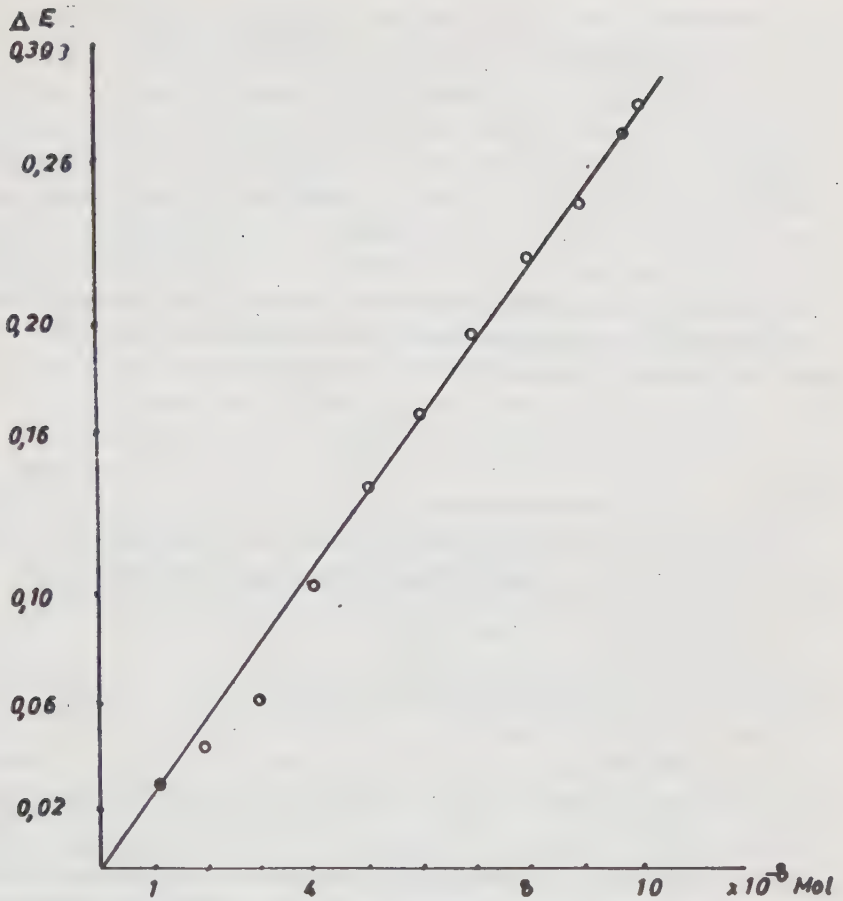


Abb. 23. Eichkurve für die SH-Gruppenbestimmung mit Cystein.

ΔE bedeutet die Differenz der Extinktionswerte zwischen Mess- und Vergleichsküvette.

nach je drei Stunden gewechselt (Puffervolumen jeweils 1 Liter).
Dann wurde noch 14 Stunden weiter dialysiert. Das Dialysat wurde
danach bei 0°C . und 17000 g 40 Minuten zentrifugiert, und die
Lösung auf 4 - 5 ml Puffer (s.o.) aufgefüllt. Diese Lösung wurde
in der Kühlzelle aufbewahrt und als LDH-Stammlösung verwandt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Biuret-Methode wurde folgendermassen vorgenommen. (91)

0,05 ml der Enzymlösung wurden in 1,5 ml H₂O bidest. gelöst. Man gibt 0,33 ml 49 prozentige Trichloressigsäurelösung hinzu und zentrifugiert ab. Das Sediment wurde in 2,5 ml Biuretreagenz gelöst und eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Mit H₂O wurde auf 5 ml aufgefüllt und in einer 1 cm Küvette die Extinktion bei 546 m μ bestimmt, (E). Der Blindwert E₀ ergab sich aus einer Vergleichslösung, die 2,5 ml Biuretreagenz in 2,5 ml H₂O bidest. enthielt. Der Proteingehalt in mg Protein pro ml Lösung wird wie folgt berechnet:

$$p = 16,5 \frac{E - E_0}{V}$$

p = Proteingehalt,

V = einpipettiertes Volumen der Enzymlösung in ml.

Die Aktivität des Enzyms wurde auf folgende Art bestimmt:

In die Messküvette wurden einpipettiert:

0,2 ml Natriumpyruvat (11 mg pro 10 ml H₂O),

0,1 ml NADH-Lösung (25 mg pro 4 ml H₂O),

2,7 ml Puffer (s.o.) und

0,001 ml LDH-Lösung.

Die Messungen wurden bei 366 m μ mit einem Photometer Eppendorf mit Thermoküvettenhalter vorgenommen. Die Lösung wurde aus der 1 zu 10 verdünnten Stammlösung oder aus dem jeweiligen Reaktionsansatz mit einer Mikroliterspritze auf einen Büchnerlöffel übertragen und damit in die Messküvette eingebracht.

Die Aktivität der Lösung in Enzymeinheiten pro ml wurde nach folgender Formel berechnet:

$$a = \frac{1000 \times E \times V \times w}{A \times U}$$

a = Aktivität der Lösung in Enzymeinheiten pro ml,

E = Extinktionsabnahme (0,1),

V = Summe der einpipettierten Volumina (ca. 3 ml),

- A = Reaktionszeit,
U = einpipettiertes Volumen der Enzymlösung und
w = Verdünnung der Enzymlösung.

III 3 c Reaktion von 3-Bromacetylpyridinhydrobromid mit Cystein und LDH.

1.) Reaktion mit Cystein.

Es wurden äquivalente Mengen von 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid und Cysteinhydrochlorid bei Zimmertemperatur in m/15 Sörensen-Puffer PH 7,1 zusammengegeben. Die Reaktion mit der SH-Gruppe wurde, wie auf Seite 59 beschrieben, mit DTNB gemessen. Dabei enthielt die Messküvette statt des Cysteinhydrochlorids das aus dem Reaktionsgefäß entnommene Reaktionsprodukt. Die Reaktion zwischen dem Hydrobromid und der SH-Gruppe des Cysteins verlief so schnell, dass schon nach 5 Minuten keine SH-Gruppen mit DTNB nachweisbar waren. Eine photographische Untersuchung der Reaktionslösung zeigte eine Hauptbande und zwei schwache Nebenbanden (s. Abb. 2. auf Seite 20).

2.) Reaktion von 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid mit LDH aus Schweineherzen bei 25 ° C.

Die Reaktion des Hydrobromids mit LDH, deren Ergebnisse auf den Seiten 21 und 22 diskutiert wurden, sind wie folgt ausgeführt worden:

Die LDH wurde vor den Umsetzungen wie auf Seite 59 beschrieben durch Dialyse gereinigt.

a.) Umsetzung von LDH mit einem 100 fachen Überschuss an Hydrobromid:

1,12 mg LDH in 0,2 ml m/15 Sörensenpuffer PH 7,1 gelöst ($1,5 \times 10^{-4}$ molar) wurden in 0,7 ml Puffer (s.o.) gegeben, und 0,843 mg Hydrobromid in 0,1 ml Puffer gelöst (3×10^{-2} molar) hinzugefügt. Das Endvolumen der Reaktionslösung betrug also 1 ml. Die Konzentration an LDH in 1 ml Lösung war nun 3×10^{-5} molar und die Konzentration an Hydrobromid 3×10^{-3} molar, was einem 100 fachen Überschuss an Hydrobromid, bezogen auf LDH, entspricht.

Aus diesem Reaktionsansatz wurde in bestimmten Zeitabständen mit einer Mikroliterspritze 0,001 ml LDH-Lösung zur Ausführung eines Aktivitätstestes und zur Aufnahme der Reaktionskinetik entnommen.

b.) Umsetzung von LDH mit einem zehnfachen Überschuss an Hydrobromid bei 25 ° C.:

1,2 mg LDH, in 0,2 ml Puffer (s.o.) gelöst ($1,6 \times 10^{-4}$ molar), wurden in 0,8 ml Puffer gegeben und 0,09 mg Hydrobromid, in 0,01 ml Puffer ($3,2 \times 10^{-2}$ molar) gelöst, zugefügt. Das Endvolumen betrug auch hier 1 ml. Die Konzentration war jetzt $3,2 \times 10^{-5}$ molar und an Hydrobromid $3,2 \times 10^{-4}$ molar. Die Probeentnahme zur Ausführung des Aktivitätstestes und zur Aufnahme der Reaktionskinetik wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Quantitative Bestimmung der SH-Gruppen mit Hilfe von DTNB bei der LDH.

Die LDH wird nach Dialyse (s.S. 59) einer Gelfiltration über Sephadex G 50 unterworfen nach dem Prinzip von Porath und Flodin (92), um eine zusätzliche Reinigung durchzuführen.

Im vorliegenden Fall wurde 1 ml LDH-Lösung (5,3 mg) auf eine Sephadexsäule (1 x 12 cm, Sephadex G 50 fine) aufgetragen und mit m/15 Sörensenpuffer PH 7,1 eluiert.

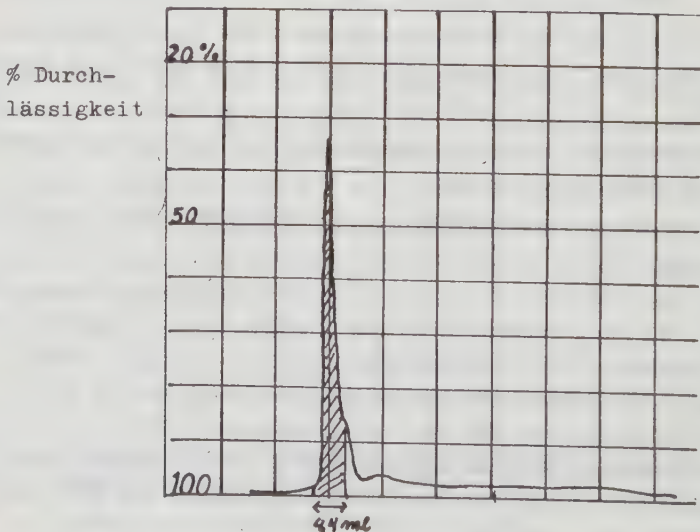


Abb. 24. Elutionsdiagramm von LDH über Sephadex (s.o.).

Die Schraffur deutet den Schnitt der aufgefangenen Hauptfraktion an. Die so gereinigte LDH wurde in 4,4 ml Eluat aufgefangen und wies eine Konzentration von 0,83 mg pro ml auf.

An dieser so behandelten LDH wurden nun SH-Gruppenbestimmungen ausgeführt.

Damit alle SH-Gruppen der Reaktion mit DTNB zugänglich werden, muss die LDH mit 10 molarem Harnstoff entfaltet werden.

Ausführung der Messungen.

In die Messküvette werden 2 ml 10 molarer Harnstoff (H_2O bidest.) und 1 ml der LDH-Lösung (s.o.) gegeben. Man lässt 15 Minuten stehen und misst die Extinktion der Lösung. Die Vergleichsküvette enthält 1 ml Puffer und 2 ml 10 molaren Harnstoff. Die Differenz der Extinktionswerte der Mess- und Vergleichsküvette ergibt ein E_3 , bezogen auf 3 ml Lösungsvolumen.

Nun wird in die Mess- und in die Vergleichsküvette je 0,1 ml DTNB-Lösung einpipettiert und alle 5 Minuten der Extinktionswert der Messlösung bestimmt, bis dieser konstant bleibt. Das ist nach ca. 30 Minuten der Fall.

Die Differenz der Extinktionswerte von Mess- und Vergleichslösung ergibt ein $E_{3,1}$, bezogen auf 3,1 ml. Dieses wird auf 3 ml umgerechnet.

E ergibt sich zu E_3 -Messküvette minus E_3 -Blindwert. Zur Ausrechnung der Mikromole SH-Gruppen wird dieser Wert in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Mikromol SH-Gruppe} = \frac{E \times \text{Vol. (3 ml)}}{D \times \epsilon}$$

Vol. = Lösungsvolumen in der Küvette,

D = Schichtdicke (1 cm),

ϵ = $13,6 \times 10^6$ (Mol.Extinktion der Verbindung II
s.S.59).

Der Wert für die Mikromole SH-Gruppen wird auf die Anzahl SH-Gruppen pro Molekül umgerechnet. Im vorliegenden Fall erhielten wir pro Molekül LDH 16,1 SH-Gruppen.

Quantitative Bestimmung von SH-Gruppen an LDH nach Hemmung mit 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid.

Die nach Seite 59 vorbehandelte LDH (5,36 mg/ml) wurde nach Seite 63 mit dem zehnfachen Überschuss an 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit war die LDH vollständig gehemmt (98 %, s. auch Seite 22 , Abb. 4.). Dann wurde der Ansatz auf einer Sephadexsäule (G 50 fine, 1 x 12 cm) der Gelfiltration unterworfen, um das überschüssige Hydrobromid von der LDH abzutrennen.

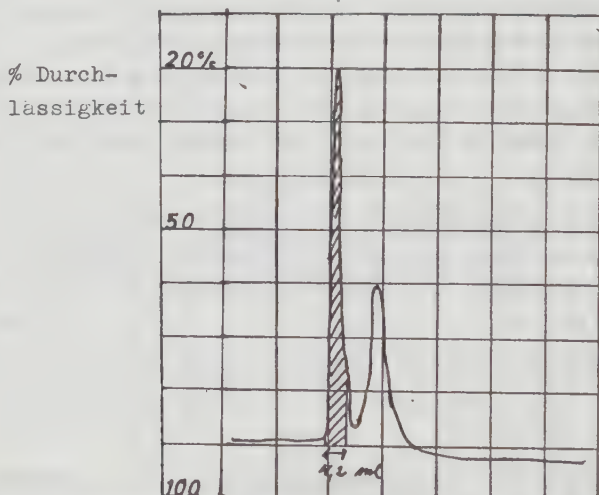


Abb. 25. Elutionsdiagramm von mit 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid gehemmter LDH über Sephadex (G 50 fine, 1 x 12 cm).

Die Schraffur deutet den Schnitt der aufgefängenen Hauptfraktion an. Die gehemmte LDH wurde in 4,2 ml aufgefangen. Die Konzentration an Protein im Eluat betrug 0,66 mg/ml.

Aus diesem Eluat wurde nun 1 ml zur SH-Gruppenbestimmung mit DTNB, wie auf Seite 64 beschrieben, abgenommen. Im vorliegenden Fall erhielten wir 12,1 bzw. 12,4 SH-Gruppen pro Molekül LDH.

Umsetzung von mit Na_2SO_3 geschützter LDH (93) mit 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid.

1 mg LDH in 0,1 ml m/15 Sörensenpuffer PH 7,1 gelöst ($2,79 \times 10^{-4}$ molar) wurde in 0,75 ml Puffer (s.o.) und 0,05 ml einer Na_2SO_3 -Lösung (100 mg pro 2 ml H_2O bidest.) bei 25°C . gegeben. Ein sofort ausgeführter Aktivitätstest zeigte eine 40 prozentige Hemmung der LDH an. Zu der so behandelten LDH wurde nun 0,781 mg Hydrobromid, in 0,1 ml Puffer gelöst ($2,79 \times 10^{-2}$ molar), gegeben. Die Konzentration der LDH in der Lösung war jetzt $2,79 \times 10^{-5}$ molar und die des Hydrobromids $2,79 \times 10^{-3}$ molar. Die Aktivität der LDH wurde, wie schon besprochen, über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 25°C . verfolgt. Es konnte keine weitere Aktivitätsabnahme festgestellt werden. Na_2SO_3 schützt demnach die LDH vor dem Angriff von 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid.

III 3 d Methoden bei der Umsetzung von Bromaceton, m-Jod-, m-Chlor-, m-Bromphenylmaleinimid und N-(γ -phenyl-n-butyl)-maleinimid mit Cystein und LDH.

Reaktion von Bromaceton im hundertfachen Überschuss mit LDH bei 25°C .

1,5 mg LDH, in 0,2 ml m/15 Sörensenpuffer PH 7,1 gelöst, ($2,07 \times 10^{-4}$ molar) wurden in 0,7 ml Puffer gegeben und mit 0,36354 ml Bromaceton in 0,1 ml Puffer ($4,15 \times 10^{-2}$ molar an Bromaceton) versetzt. Die Konzentration der LDH in 1 ml war $4,15 \times 10^{-5}$ molar. Die Konzentration an Bromaceton $4,15 \times 10^{-3}$ molar. In bestimmten Zeitabständen erfolgte die Probeentnahme für die Aktivitätsteste und für die Aufnahme der Reaktionskinetik, wie auf Seite 61 ausgeführt. Die Ergebnisse dieser Umsetzung wurden auf Seite 24 bereits diskutiert. (s.Abb.6.)

Reaktion von m-Jodphenylmaleinimid mit Cystein und LDH bei 25°C .

1.) Reaktion mit Cystein.

Die Umsetzung mit Cystein wurde analog der Reaktion von 3-Bromacetylpyridiniumhydrobromid mit Cystein durchgeführt und verfolgt. Da das Imid in H_2O schwer löslich ist, mussten wir die Verbindung zunächst in Methanol auflösen, um diese so in gelöster Form mit Cystein in Puffer reagieren lassen zu können.

3 mg Imid wurden in 1 ml Methanol gelöst (10^{-2} molar) und hier-von 0,1 ml zu 0,9 ml einer 0,175 mg enthaltenden Cysteinhydrochlorid-lösung (m/15 Sörensenpuffer PH 7,1) gegeben. Die Konzentra-tion an Cystein war 10^{-3} molar und an Imid ebenfalls 10^{-3} molar. Die Reaktion verlief innerhalb 5 bis 6 Minuten.

2.) Umsetzung von m-Jodphenylmaleinimid mit LDH bei 25 ° C.

Wegen der Schwerlöslichkeit des Imids in Puffer brachten wir zu-nächst eine abgewogene Menge Imid in fester Form mit der in Puf-fer gelösten LDH zur Umsetzung.

Zu einer Lösung von 1,2 mg LDH in 1 ml Puffer ($3,2 \times 10^{-5}$ molar) wurde 3 mg Imid gegeben. Von Zeit zu Zeit wurde eine Probe, wie schon beschrieben (s.S.61), zum Aktivitätstest und zur Aufnahme der Reaktionskinetik aus der Lösung entnommen. Es konnte inner-halb von 24 Stunden keine Hemmung festgestellt werden.

Inkubation von Imid in gelöster Form.

Wir lösten nun das Imid in einer 10 prozentigen methanolischen Pufferlösung auf, nachdem wir zunächst festgestellt hatten, dass LDH in einer Lösung von Puffer zu Methanol wie 10 zu 1 innerhalb von 24 Stunden bei 25 ° C. stabil war, und brachten das Imid,auf diese Weise gelöst, mit LDH zur Reaktion.

4,5 mg Imid wurden in 1 ml Methanol gelöst ($1,5 \times 10^{-2}$ molar), und von dieser Stammlösung 0,1 ml in 0,7 ml Pufferlösung gegeben. Das Imid konnte so in Lösung gehalten werden. Zu dieser Imidlö-sung wurde 1,12 mg LDH in 0,2 ml Puffer gelöst ($1,5 \times 10^{-4}$ molar) hinzugefügt. Die Konzentration an Imid war $1,5 \times 10^{-3}$ molar und an LDH 3×10^{-5} molar, was einen fünfzigfachen Überschuss von Imid gegenüber LDH entspricht. Die Probeentnahme zur Aktivitätsmessung und zur Aufnahme der Reaktionskinetik gestaltete sich wie schon beschrieben.

Reaktion von m-Chlorphenylmaleinimid mit Cystein und LDH bei 25 ° C.

Die Reaktion mit Cysteinhydrochlorid wurde wie beim m-Jodphenyl-maleinimid (s.S.66) durchgeführt und lief ebenfalls innerhalb von 5 bis 6 Minuten ab.

Umsetzung von m-Chlorphenylmaleinimid mit LDH bei 25 ° C.

a.) Inkubation von Imid in fester Form.

Auch dieses Imid erwies sich als in Puffer schlecht löslich. Wir brachten daher wieder eine abgewogene Menge mit in Puffer gelöster LDH zur Reaktion. Zu diesem Zweck wurden 2,07 mg m-Chlorphenylmaleinimid eingewogen und in eine Lösung von 1,2 mg LDH ($3,2 \times 10^{-5}$ molar) in 1 ml Puffer gegeben.

Von Zeit zu Zeit wurde mit einer Mikroliterspritze eine Probe entnommen, um die Aktivität des Enzyms zu testen und eine Reaktionskinetik aufzunehmen. Die Ergebnisse wurden bereits auf Seite 27 diskutiert.

b.) Inkubation von Imid in gelöster Form.

m-Chlorphenylmaleinimid wurde nun, wie schon bei m-Jodphenylmaleinimid beschrieben, in einer zehnprozentigen methanolischen Pufferlösung aufgelöst. Zu diesem Zweck wurde 3 mg Imid in 1 ml Methanol gelöst ($1,5 \times 10^{-2}$ molar) und hiervon 0,1 ml, enthaltend 0,3 mg Imid, in 0,7 ml Puffer (s.o.) gelöst. Das Imid blieb so in Lösung. Zu diesem Ansatz wurden nun 1,12 mg LDH in 0,2 ml Puffer ($1,5 \times 10^{-4}$ molar) gefügt. Die Konzentration an Imid war $1,5 \times 10^{-3}$ molar und an LDH 3×10^{-5} molar, was einem 50 fachen Überschuss an Imid gegenüber LDH entspricht. Die Probeentnahme zur Aufnahme der Reaktionskinetik und zur Durchführung der Aktivitätsteste wurde wie oben ausgeführt.

Reaktion von m-Bromphenylmaleinimid mit Cystein und LDH bei 25 ° C.

Die Reaktion mit Cysteinhydrochlorid wurde, wie bei m-Jodphenylmaleinimid beschrieben, durchgeführt und ergab das gleiche Resultat.

Umsetzung von m-Bromphenylmaleinimid mit LDH bei 25 ° C.

a.) Inkubation von Imid in fester Form.

Eine abgewogene Menge des Imids (2,52 mg) wurden in einer Lösung von 1,2 mg LDH in 1 ml Puffer ($3,2 \times 10^{-5}$ molar) suspendiert und auf diese Weise zur Reaktion gebracht, da das Imid in H_2O ebenfalls schlecht löslich ist. Die Probeentnahme aus der Reaktions-

lösung zur Aufnahme der Reaktionskinetik und der Aktivitätsteste gestaltete sich wie schon beschrieben (s.S.61)

b.) Inkubation von Imid in gelöster Form.

Wir lösten das Imid (3,8 mg) ebenfalls, wie schon beschrieben, in 1 ml Methanol auf ($1,5 \times 10^{-2}$ molar). 0,1 ml von dieser Stammlösung wurden in 0,7 ml Puffer gegeben, wobei das Imid in Lösung blieb. Hierzu fügten wir 1,12 mg LDH in 0,2 ml Puffer ($1,5 \times 10^{-4}$ molar). Die Konzentration an LDH in der Lösung war nun 3×10^{-5} molar und an Imid $1,5 \times 10^{-3}$ molar, einem fünfzigfachen Überschuss an m-Bromphenylmaleinimid entsprechend. Die Probeentnahme zur Durchführung der Aktivitätsteste und zur Aufnahme der Reaktionskinetik ist schon beschrieben worden (s.S.61).

Die Ergebnisse wurden bereits auf Seite 28 besprochen.(s.Abb.8.)

Reaktion von N-(γ -phenyl-n-butyl)-maleinimid mit Cystein und LDH bei 25 ° C.

Das Cystein wurde, wie bei m-Jodphenylmaleinimid auf Seite 66 beschrieben, zur Reaktion gebracht und verfolgt. Beim Verdünnen der methanolischen Stammlösung des Imids mit Puffer fiel zwar ein Teil der Verbindung wieder aus, was ihre extrem schlechte Löslichkeit dokumentierte. Nach Zugabe von Cysteinhydrochlorid ging das Imid jedoch sofort wieder in Lösung und reagierte innerhalb von 5 bis 6 Minuten.

Reaktion von N-(γ -phenyl-n-butyl)-maleinimid mit LDH.

a.) Inkubation in fester Form.

Wegen der Schwerlöslichkeit des Imids in Puffer (m/15 Sörensenpuffer PH 7,1) wurden 2,29 mg abgewogen, in 1 ml Puffer, der 1,2 mg LDH enthielt ($3,2 \times 10^{-5}$ molar) suspendiert und so mit der gelösten LDH zur Reaktion gebracht. Die Aufnahme der Reaktionskinetik und die Probeentnahme zum Aktivitätstest wurden bereits beschrieben (s.S.61).

b.) Versuch der Inkubation in gelöster Form.

Wir versuchten nun, wie schon beschrieben, das Imid in gelöster Form mit LDH zur Reaktion zu bringen. In 1 ml Methanol wurden

daher 4,71 mg ($2,07 \times 10^{-2}$ molar) der Verbindung gelöst und hier-von 0,1 ml in 0,7 ml Puffer (s.o.) gegeben. Hierbei fiel der gröss-te Teil des Imids wieder aus. Wir fügten 1,5 mg LDH, in 0,2 ml Puf-fer gelöst ($2,07 \times 10^{-4}$ molar), hinzu. Die Konzentration an LDH war nun $4,15 \times 10^{-5}$ molar. Die Imidkonzentration konnte aus dem oben erwähnten Grunde nicht mehr genau angegeben werden. Maximal hätte sie $2,07 \times 10^{-3}$ molar sein sollen, was einem fünfzigfachen Über-schuss an Imid, bezogen auf LDH entsprochen hätte.

Die Ergebnisse wurden bereits auf den Seiten 30 bis 32 besprochen (s. Abb. 9. und 10.).

III 3 e Löslichkeit der Maleinimide in Puffer.

Löslichkeit von m-Jodphenylmaleinimid I, N-(γ -phenyl-n-butyl)-maleinimid II, m-Chlorphenylmaleinimid III und m-Bromphenylmalein-imid IV in m/15 Sörensenpuffer PH 7,1.

Um Aufschluss über die unterschiedliche Löslichkeit der vier ge-nannten Maleinimide in Puffer zu erhalten, gaben wir jeweils die gleichen Mengen Imid, wie auf den Seiten 67 bis 69 zur Inkubation in fester Form beschrieben, in 1 ml Puffer:

Einwaagen:

I	=	2,99 mg,
II	=	2,29 mg,
III	=	2,07 mg und
IV	=	2,52 mg.

Nach 24 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde abzentrifu-giert, der Überstand im Verhältnis 1 zu 10 verdünnt, und jeweils im UV-Bereich von 360 bis 240 m μ ein Spektrum aufgenommen. Wir erhielten folgende Extinktionswerte:

I	:	E	=	0,
II	:	E	=	0,
III	:	E _{262 mμ}	=	1,47 und
IV	:	E _{264 mμ}	=	0,540.

Die Imide III und IV zeigten bei 262 m μ bzw. bei 264 m μ ein Maxi-mum, dessen Extinktionswert gemessen wurde. Diese Verbindungen wa-ren offensichtlich zum Teil innerhalb von 24 Stunden in Lösung ge-gangen. Der Überstand der Imide I und II zeigte keinen Extinktions-

anstieg, was die äusserst schlechte Löslichkeit dieser Verbindungen dokumentierte.

Der Teil der Imide, der in Lösung gegangen war, war nach 24 Stunden zu den entsprechenden Säureamiden hydrolysiert, wie eine pherographische und chromatographische Prüfung ergab. Die Ergebnisse wurden im Zusammenhang mit der Hemmwirkung der vier Imide auf Seite 28 besprochen.

III 3 f Vorbereitung zur Aktivierung von m-Bromphenylmaleinimid in LDH.

Eine Lösung von 18,12 mg LDH, in 3 ml Sörensenpuffer PH 7,1, wurde mit 25,2 mg m-Bromphenylmaleinimid, das im Reaktionsgefäss fein verrieben wurde, 24 Stunden inkubiert. Die LDH wurde dabei zu 65 % gehemmt. Nach 24 Stunden wurde eine halbe Stunde bei 0° C. und 17000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann der Gelfiltration auf Sephadex (G 50 fine, 1 x 40 cm) unterworfen, um restliches Imid abzufangen. Die Hauptfraktion wurde in 21 ml Puffer aufgefangen, und die darin enthaltene LDH tryptisch verdaut. Hierzu wurde soviel Harnstoff zu dem Bluat gegeben (21 ml), bis die Lösung 8 molar an Harnstoff war, und zur Auffaltung der LDH 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen. Dann wurde 20 Stunden gegen H₂O dialysiert, wobei dieses dreimal gewechselt wurde.

Das Dialysat wurde mit soviel festem Ammoniumbicarbonat versetzt, bis die Lösung 1/10 molar daran war. Dann wurde 1/30 bis 1/50 des Gewichtes der in der Lösung enthaltenen LDH an Trypsin zugegeben und bei 37° C. 20 Stunden verdaut. Nach Gefriertrocknen und Einschmelzen in ein Quarzrohr wurde das Proteingemisch, wie auf den Seiten 34 und 54 beschrieben, mit Neutronen 36 Stunden lang bestrahlt und ein Fingerprint angefertigt (94), (s. Abb. 26).

Die Substanz wurde in B auf das trockene Papier aufgetragen, das Blatt in die Elektrophoresekammer (95, 96) eingebracht, mit Pyridin-Eisessig-Puffer PH 6,5 eingesprüht und mit Filterpapier trockengewalzt. Dann wurde eine Stunde bei 40 mAmp. pherographiert. Nach Trocknen bei 60° C. wurde in Butanol-Eisessig-H₂O (3 : 1 : 1) 20 Stunden aufsteigend chromatographiert, und die Peptidbanden

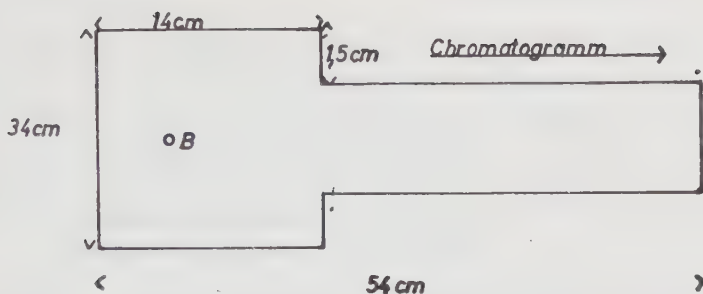


Abb. 26. Form eines Papierchromatogramms für ein Fingerprint.
Es wurde M+N-Papier 2214 F verwendet.

durch Besprühen mit Ninhydrin sichtbar gemacht.

Da infolge der kurzen Halbwertszeit von Brom^{82} (36 Stunden), ein Radiogramm von diesem Fingerprint nicht mehr angefertigt werden konnte, schnitten wir gleich grosse Plättchen aus (1 x 1 cm) und bestimmten die Aktivität mit einem Methandurchflusszähler (FK 407). Eingestellte Empfindlichkeit: 500 mVolt, Messspannung: 3,8 kVolt. Es wurden die Impulse pro Minute gezählt. Das Ergebnis wurde auf Seite 34 dargestellt und diskutiert (s. Abb.11.).

IV ZUSAMMENFASSUNG.

An Hand einer Gegenüberstellung der Inhibitorwirkung von 3-Brom-acetylpyridiniumhydrobromid und Bromaceton auf LDH wurde gezeigt, dass ein SH-Reagenz mit reaktivem Halogen dann eine höhere Hemmwirkung aufweist, wenn es eine gewisse chemische Verwandtschaft mit dem Coenzym hat. Auf Grund dieser Eigenschaft gelangt es bevorzugt in das schwer zugängliche aktive Zentrum des Enzyms und kann dort mit den essentiellen SH-Gruppen reagieren.

Es wurde die Hemmwirkung einiger Maleinimide mit Substituenten verschieden grosser Molekülradien auf LDH untersucht.

Nach einer Arbeitshypothese sollten sich die essentiellen SH-Gruppen in Hohlräumen des Enzyms befinden, in die nur entsprechend günstig gebaute Maleinimide gelangen können. Die Unterschiede in der Hemmwirkung von m-Jod-, m-Brom- und m-Chlorphenylmaleinimid auf LDH waren nur bedingt durch ihre unterschiedliche Wasserlöslichkeit, nicht aber durch ihre verschiedene Molekülgrössen.

Das nach der erwähnten Arbeitshypothese besonders günstig gebaute N-(*p*-phenyl-*n*-butyl)-maleinimid ist erstmalig synthetisiert worden und zeigte unter Berücksichtigung seiner schlechten Löslichkeit die erwartete gute Hemmwirkung.

Schliesslich konnte durch Neutronenbeschuss das Bromatom in m-Bromphenylmaleinimid aktiviert werden. Es gelang, das so entstandene m-Brom⁸²phenylmaleinimid zu isolieren. Beim Neutronenbeschuss des in LDH eingebauten m-Bromphenylmaleinimids nach Spaltung des Enzyms entstand ebenfalls m-Brom⁸²phenylmaleinimid. Nach chromatographischer Auftrennung des Peptidgemisches wurde der Hauptteil der Radioaktivität in einer Bande aufgefunden.

Es war weiterhin versucht worden, Nicotinamid-6-chlorpurindinucleotid als Vehikelsubstanz zu synthetisieren. Die Reindarstellung des 6-Chlorpurinribotids nach einem neuen, vereinfachten Verfahren gelang. Bei der Kondensationsreaktion mit Nicotinamidmononucleotid zum Dinucleotid wurde das Chloratom im Purinkern hydrolytisch abgespalten, so dass Nicotinamid-6-chlorpurindinucleotid nicht erhalten werden konnte.

V LITERATURVERZEICHNIS.

- (1) A.Schwartz u.A.Oschmann; C.R.Soc.Biol.Paris 92, 169 (1925),
- (2) M.Dixon; Nature, London, 140, 806 (1937),
- (3) E.Möller u.T.Wagner-Jauregg; Z.physiolog.Chem. 236, 222
(1935),
- (4) N.Hellström; Z.physikal.Chem.A. 157, 242 (1931),
- (5) T.Bersin; Biochem.Z. 248, 3 (1932),
- (6) F.Dickens; Biochem.J. 27, 1141 ; 1933),
- (7) J.Quwastel u.A.Wheatley; Biochem.J. 26, 2169 (1932),
- (8) L.Rapkine; C.R.Soc.Biol.Paris 112, 790 u.1294 (1933),
- (9) A.Mirsky u.M.Anderson; J.gen.physiol. 18, 307 (1935),
- (10) L.Hellermann; Physiol.Revs. 17, 454 (1937),
- (11) S.E.Lewis; Nature,London, 161, 692 (1948),
- (12) M.Dixon u.D.Needhams; Nature, London, 158, 432 (1946),
- (13) G.R.Bartlett u.E.Barron; J.Biol.Chem. 170, 67 (1947),
- (14) Y.Avidor u.J.Mayer; Biochem.J. 63, 613 (1956)
- (15) F.Busch u.P.V.Nair; J.Biol.Chem. 229, 377 (1957)
- (16) M.Dixon; in Symposium on the Biochem.Reactions of Chemical
Warfare Agents (Biochem.Soc.Symposium Nr.2)
ed. R.T.Williams (Cambridge University Press
1948) p. 39,
- (17) M.Dixon u.E.Webb; Enzymes 341 ff, sec.Edition 1964,
- (18) A.Ford-Moore; Porton Report to the Ministry of Supply
(1936) quoted in Symposium on the Biochem.
Reactions of Chem.Warfare Agents (Biochem.
Soc.Symposium Nr.2) ed.R.T.Williams (Cam-
bridge University Press 1948), p.39,
- (19) Z.M.Bacq; Experimentia 2, 349 u.385 (1946),
- (20) J.F.Mackworth; Biochem.J. 42, 82 (1948),
- (21) O.B.Helfrich u.E.Reid; J.Am.Chem.Soc. 42, 1208 (1920),
- (22) P.D.Boyer; The Enzymes, Vol. 1, 530 - 32 (1959),
- (23) R.A.Peters; Nature, London, 159, 149 (1947),
- (24) St.C.Harvey u.M.Nickerson; J.Pharmacol.Exptl.Therapie
112, 274 (1954),
- (25) Nachrichten aus Chemie und Technik 14, Nr.11 (1966),
- (26) J.E.Morgan u. E.Friedmann; Biochem.J. 733 (1938),

- (27) R.Kuhn u.H.Beinert; Ber. 76, 904 (1943),
Ber. 77, 606 (1944),
- (28) D.H.Marrian u.J.S.Reuss; Brit.J.Pharm.and Chemotheraphie
4, 105 (1949),
- (29) E.Friedman; Biochem.et Biophys.Acta 9, 65 - 75 (1952),
- (30) H.Holzer et al.; Biochem.Z. 328, 163 (1956),
- (31) S.Petersen, W.Gauss u.Urbeschad; Angew.Chem. 67, 217
(1955),
- (32) A.Schöberl; Angew.Chem. 70, 646 (1958),
- (33) W.Gruber, K.Warzecha, G.Pfleiderer u.Th.Wieland; Biochem.
Z. 336, 107 (1962/63),
- (34) O.Blumenfeld u.G.E.Ferlman; J.Biol.Chemistry 236, 2472
(1961),
- (35) G.Clark-Walker, H.C.Robinson; J.Cehm.Soc.London 2810 (1961),
- (36) L.Segal u.H.Gold; J.Biol.Chem. 238, 2589 - 90 (1963),
- (37) F.T.Ott u.L.Recant; Proceedings of the Society for Experi-
mental Biol.and Medic.Vol.112 Nr.40,
880 (1963),
- (38) T. Sekine u.M.Yamaguchi; J.of Biochem.Tokyo Vol.54 Nr. 2
198 (1963),
- (39) J.Schlesinger; Brookhaven Symposia in Biology Nr.17, 73
Subunit Structure of Proteins Biochem.et Genetic Aspects
(1964),
- (40) J.J.Holbrook,G.Pfleiderer,J.Schnetger u.S.Dicmair; Biochem.
Z. 344, 1 - 14 (1966),
- (41) J.J.Holbrook u.G.Pfleiderer; Biochem.Z. 342, 111 (1965),
- (42) U.Gröschel-Stewart u.F.Turba; Biochem.Z. 337, 104 - 8
(1963),
- (43) H.Merz,G.Pfleiderer u.Th.Wieland; Biochem.Z.342, 66 (1965)
- (44) E.Searle u.H.Arnold;United States Patent Office 2,462,835
patented Mar. 1949,
- (45) U.S. 2,686,773 August 1954,
- (46) H.Arnold u.E.Searle; United States Patent Office
U.S. 2,462,835
- (47) R.Benesch u.R.E.Benesch, M.Gutchon u.L.Laufer; Science
123, 981 (1956),

- (48) K.C.Tsou, R.J.Barnett u.A.M.Seligman; J.Am.Chem.Soc. 77,
4613 (1955),
- (49) C.A.Price u.C.W.Campbell; Biochem.J. 65, 512 (1957),
- (50) A.H.Gold u.L.H.Segal; Biochem. 4, 1506 (1956),
- (51) A.P.Nygaard; Acta chem.Scand. 10, 397 (1956),
- (52) Y.Takenaka u.G.W.Schwert; J.Biol.chem. 223, 157 (1956),
- (53) N.O.Kaplan; Brookhaven Symposium in Biology Nr. 17, 143
(1964),
- (54) D.Crowfoot-Hodkin; Angew.Chem. 77, 954 (1965), Nobelvortrag,
- (55) J.J.Holbrook; Biochem.Z. 344, 141 - 52 (1966),
- (56) J.V.Eys u.N.O.Kaplan; Biochem.et Biophys.Acta Vol. 23, 574
(1957),
- (57) B.M.Anderson u.M.L.Reynolds; Biochem.et Biophys.Acta
Vol. 96, 46 (1965),
- (58) A.Hampton u.M.H.Maguire; J.Am.Chem.Soc. 83, 150 (1961),
- (59) S.K.Aoy, C.Kvam, J.Dahl u.R.Purks; J.Biol.Chem. 236, 1158
(1961),
- (60) G.Pfleiderer, C.Woenckhaus, K.Scholz u.H.Feller; Justus
Liebigs Annalen der Chemie 675, 205 (1964),
- (61) G.Pfleiderer, C.Woenckhaus u.K.Scholz; Angew.Chem. 75, 92
(1963),
- (62) G.M.Tener; J.Am.Chem.Soc. 83, 159 (1961),
- (63) C.S.Haynes u.F.A.Isherwood; Nature, London, 164, 1107
(1949),
- (64) G.B.Brown; Biochemical Preparations Vol. 10, 145 (1963),
- (65) Biochem.Taschenbuch S.509, herausgegeben von H.M.Rauen
(1958),
- (66) A.Hampton u.A.Patterson; Biochem. et Biophys.Acta 114,
185 (1966),
- (67) D.Glick; Methods Biochem.Analyt. Bd.1, Intersci W.Y. 298
(1954),
- (68) A.A.Hirata u.D.Appleman; Anal.Chem. 31, 2097 (1959),
- (69) L.Schuster, N.O.Kaplan u.F.E.Stolzenbach; J.Biol.Chem.
215, 195 (1955),
- (70) N.A.Hughes, G.W. Kemer u.A.Todd; J.Chem.Soc. 3, 3733
(1957),

- (71) O.Meyerhof; P.Ohlmeier u.W.Möhl; Biochem.Z. 297, 113
(1938),
- (72) E.Kodicek u.K.K.Reddi; Nature, London, 168, 475 (1951),
- (73) Houben-Weyhl, Methoden der org.Chemie 4. Auflage, Heraus-
geber: E.Müller, Bd. 5/4 Halogenverbindungen
(Br/J) Seite 178,
- (74) A.Alberts, B.Beckmann; J.Am.Chem.Soc. 57, 1286 (1935),
- (75) D.Jerchel u.H.Fischer; A. 590, 224 (1954),
- (76) P.F.Towbridge, O.C.Diehl; J.Am.Chem.Soc. 19, 570 (1897),
- (77) A.Dornow, H.Machens u.K.Bumken; Ber. 84, 148 (1951),
- (78) W.Wunderlich; J.für prakt.Chemie 274, 302 (1955),
- (79) A.Dornow u.W.Schacht; Ber. 82, 120 (1949),
- (80) E.Müller; s.(73), Seite 182
- (81) P.Karrer u. J.F.Store; Helv.chim.Acta 20, 418 (1937),
- (82) M.R.Lamborg, R.M.Burton u.N.O.Kaplan; J.Am.Chem.Soc.
79, 6173 (1957),
- (83) E.Searle et al.; U.S. 2,444,536 July 1948,
- (84) United States Rubber Co.Brit. 880,947 Appl.Mar.31 (1960),
U.S. May (1960) 7pp.,
- (85) H.Fletcher u.JR.Little; U.S. 3,153,014 (cl. 260 - 78)
Okt.13, 1964 Apply May 1960, 7 pp.,
- (86) D.C.Thomson, W.Hensley u.J.N.Lambrach (Boyce Thompson
Inst. Younkers N.Y.) Contribut. Boyce Thompson Inst.
22, 67 (1963),
- (87) A.E.Kretov u.N.E.Kalchitskaya; J.Gen.chem.USSR 26 (221-
229), (1956),
- (88) Ind.Uses Large Radiative Source Proc.Conf.Salzburg,Austria
1329, Discussion 342 - 44 (1963),
- (89) M.Tugtepe; Chem.Abstracts 60, 13418 f (1964),
- (90) G.L.Ellmann; Arch.of Biochem.et Biophys. 82, 70 - 77 (1959),
- (91) G.Beisenherz, H.Baltze, T.Bücher, R.Czok, K.H.Garbade,
E.Meyer-Arend u.G.Pfleiderer; Z.Naturforsch. 8 b, 555
(1953),
- (92) J.Porath u.P.Flodin; Nature,London, 183, 1657 - 59 (1959),
- (93) K.Rajewsky; Mündl. Mitteilung,
- (94) V.M.Ingram; Nature, London, 180, 326 (1957),
und Biochem. et Biophys. Acta (Amst.) 28, 539
(1958),

- (95) Th.Wieland u.G.Pfleiderer; Angew. Chem. 67, 257 (1955),
- (96) Th. Wieland u.G.Pfleiderer; Angew.Chem. 69, 199 (1957).

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr.G. Pfeleiderer in der Zeit von April 1964 bis Juni 1966 im Institut für Biochemie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt am Main durchgeführt.

Meinem sehr verehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. G. Pfeleiderer

danke ich herzlich für die Stellung des Themas, für die wertvollen Hinweise und für die freundliche Unterstützung, die mir bei der Ausführung der vorliegenden Arbeit zuteil wurde.

Des weiteren danke ich den Herren Dr. C. Woenckhaus und Dr. A. Stock für anregende Diskussionen und Hinweise.

VI LEBENSLAUF.

Am 4. Mai 1937 wurde ich als Sohn des Landwirts Gottfried Schnetger und seiner Ehefrau Ella, geb. Bueb, in Berlin geboren.

Infolge der Kriegssereignisse besuchte ich nacheinander die Volksschulen in Gross-Luckow/Mecklenburg und Nieder-Liebersbach/Odenwald. Ostern 1947 trat ich in das Realgymnasium in Weinheim a.d. Bergstrasse ein und wechselte 1951 auf das Nordpfalzgymnasium zu Kirchheimbolanden über, wo ich Ostern 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1956 begann ich das Chemiestudium in Tübingen und wechselte im Wintersemester 1956/57 an die Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt/Main.

Im Sommersemester 1960 verbrachte ich nach bestandenen Vordiplom ein Studiensemester in Wien. Im Juni 1962 legte ich die mündliche Diplomprüfung ab und fertigte unter der Anleitung von Herrn Professor G. Pfeleiderer meine Diplomarbeit über das Thema:

" Darstellung einiger Maleinimide und ihre Reaktionen mit SH-Gruppen an Modellen und nativen Enzymen"

an. Im Anschluss daran begann ich meine Doktorarbeit.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Professor Dr. G. Pfeleiderer, Direktor des Instituts für Biochemie an der Frankfurter Universität, ausgeführt.

